

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1935-1936. — N° 64

LA VACCINATION CONTRE LA FIÈVRE JAUNE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le vendredi 20 décembre 1935

PAR

René-Aloïs-Alphonse WEBER

Élève du Service de Santé de la Marine

Né à SAINT-LAURENT (Vosges), le 30 novembre 1910

Examinateurs de la Thèse	{	MM. BONNIN, professeur.....	Président.
		MANDOUL, professeur.....	Juges.
		CREYX, professeur.....	
		DE GRAILLY, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1935

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1935-1936. — N° 64

LA VACCINATION CONTRE LA FIÈVRE JAUNE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le vendredi 20 décembre 1935

PAR

René-Aloïs-Alphonse WEBER

Élève du Service de Santé de la Marine

Né à SAINT-LAURENT (Vosges), le 30 novembre 1910

Examineurs de la Thèse	{	MM. BONNIN, professeur.....	Président.
		MANDOUL, professeur.....	Juges.
		CREYX, professeur.....	
		DE GRAILLY, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1935

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.

ASSESEUR : M. LABAT.

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. POUSSON, MOURE, RIVIÈRE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE,
CASSAËT, CHAVANNAZ, PACHON

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique médicale.....	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	MANDOUL.
id.....	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurgicale.....	BÉGOUIN.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
Clinique chirurgicale et gynécologique.....	GUYOT.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie.....	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales.....	CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants.....	CRUCHET.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale.....	DELAUNAY.
Anatomie pathol. et microscopie clinique.....	SABRAZÈS.	Physique médicale et pharmaceutique.....	C. SIGALAS.
Anatomie.....	VILLEMIN.	Médec. co. oniale et clin. des mal. exotiques.....	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques.....	PETGES.
Hygiène.....	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires.....	DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie.....	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales.....	ABADIE.
Electroradiologie et lin. d'électricité médie.....	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	PORTMANN.
Chimie.....	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée.....	LABAT.
Botanique et matière médicale.....	GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	GREYX.
Pharmacie.....	DUPOUY.	Clinique dentaire.....	N.

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). PAPIN (Chirurgie générale).
R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

	MM.		MM.
Anatomie.....	DUBECQ.	Chirurgie générale.....	CHARRIER.
id.....	DUFOUR.	id.....	LOUBAT.
Physiologie.....	FABRE.	Ob. tétrique.....	RIVIÈRE.
Médecine générale.....	DAMADE.	Ophtalmologie.....	BEAUVIEUX.
id.....	PIÉCHAUD.	Oto-rhino-laryngologie.....	DESPONS.
id.....	DELMAS-MARSALET.	Dermatologie et syphiligraphie.....	JOULIA.
id.....	DE GRAILLY.	Physique médicale.....	WANGERMEZ.
id.....	FONTAN.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.....	VITTE.

COURS COMPLÉMENTAIRES

	MM.		MM.
Physiologie.....	FABRE.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.
Médecine opératoire.....	PAPIN.	Physique médicale et pharmaceutique.....	WANGERMEZ.
Accouchements.....	RIVIÈRE.	Botanique.....	GIRARD.
Pathologie médicale.....	DELMAS-MARSALET.	Médecine légale.....	DERVILLÉE.
Puériculture.....	FAUGÈRE.	Bactériologie.....	MOUREAU.
Pharmacie chimique.....	VITTE.		

Ophtalmologie..... MM. CABANNES (en congé).
Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A LA MEMOIRE DE MON ONCLE

MORTS POUR LA FRANCE

A MA MERE

Dont la bonté étendue jusqu'aux sacrifices a permis que j'atteigne au seuil de ma carrière.

Qu'elle trouve dans ce travail un premier et fervent témoignage de mon infinie reconnaissance et de ma profonde affection.

A MON ONCLE

A MES AMIS

LES DOCTEURS J. BOUILLOC, J. GARIOU, R. GOUNELLE

ET G. EGGENBERGER

Médecins des Troupes coloniales.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MES MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL CAZAMIAN

*Directeur de l'Ecole principale du Service de Santé
de la Marine et des Troupes coloniales,
Officier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

Dont la bienveillance à notre égard
nous a permis de séjourner à l'Institut
Pasteur de Paris pour l'édification d'une
part de ce mémoire.

A MON PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BONNIN

*Professeur de Médecine coloniale et de Clinique des maladies exotiques
à la Faculté de Médecine de Bordeaux,
Médecin des Hôpitaux,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

Qui nous a traité avec une constante
bienveillance et qui nous a grandement
honoré en nous permettant de présenter ce travail.

Qu'il veuille trouver ici le témoignage
de notre vive et respectueuse reconnaissance.

AVANT-PROPOS

Avant de présenter ce travail, nous tenons à exprimer notre gratitude à ceux qui nous ont aidé et conduit :

A M. le Professeur A. Pettit, membre de l'Académie de médecine, qui a bien voulu nous recevoir dans son service de l'Institut Pasteur de Paris.

A M. le Docteur G. Stéfanopoulo, son chef de laboratoire, dont la compétence nous a permis de nous documenter d'abondance, et qui a bien voulu nous initier à la pratique de la séro-virus-vaccination, ainsi qu'aux manipulations élémentaires du virus de Theiler et du sérum anti-amaril (entretien des souches, titrages...).

A M. le Docteur Recio (de La Havane), dont les connaissances à propos de l'histoire de la fièvre jaune et de son épidémiologie sont une source inépuisable, et qui a bien voulu nous communiquer des renseignements inédits dont une part est rapportée à « l'histoire de la vaccination ».

A M. le Docteur Jean Laigret, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Tunis, qui nous a traité en camarade et mis à notre disposition tous les renseignements qui se rapportent à la virus-vaccination.

A M. le Docteur Richet, médecin des troupes coloniales, qui nous a témoigné son amitié à maintes reprises, mais tout particulièrement en nous livrant les documents où sont consignés les premiers travaux des savants de la fondation Rockefeller à Lagos (Nigéria), à Accra (Côte de l'Or) et à New-York.

LA VACCINATION CONTRE LA FIÈVRE JAUNE

PLAN

INTRODUCTION.

HISTORIQUE.

CHAPITRE I. — *Adaptation du virus amaril au système nerveux de la souris* (le virus de Theiler).

- I. — La maladie de la souris. Voies d'inoculation.
- II. — Adaptation du virus neurotrope au cobaye et au hérisson.
- III. — Unicité du virus amaril.

CHAPITRE II. — *Les preuves sérologiques de l'immunité anti-amarile.*

- I. — Le test de séro-protection intracérébral de la souris.
- II. — Le test de protection intrapéritonéal de la souris.

CHAPITRE III. — *Action du virus de Theiler sur le singe.*

- I. — Virulence du virus de Theiler pour le singe.
 - A. Inoculation directe au singe du cerveau de souris virulent par les différentes voies.
 - B. Retour du virus de Theiler à la virulence naturelle :
 - par primo-inoculation;
 - par passages chez l'homme et le singe;
 - par passage chez le moustique.
- II. — Propriétés immunisantes du virus de Theiler chez le singe.

CHAPITRE IV. — *Pouvoir pathogène du virus de Theiler pour l'homme.*

- I. — Révélé au cours d'inoculations accidentelles.
- II. — Révélé au cours de la vaccination.
- III. — Action pathogène du virus rapportée dans le cadre de la virus-vaccination.

CHAPITRE V. — *La séro-virus-vaccination.*

- I. — Base expérimentale de la méthode.
- II. — Evolution de la technique.
- III. — Réactions observées au cours de la séro-virus-vaccination.
- IV. — Immunité conférée.
- V. — Circulation du virus dans le sang des vaccinés.

CHAPITRE VI. — *La virus-vaccination.*

- I. — Evolution de la technique.
- II. — Réactions observées au cours de la vaccination.
- III. — Immunité conférée.
- IV. — Circulation du virus dans le sang des vaccinés.

CHAPITRE VII. — *Etude critique.*

- I. — La vaccination est-elle efficace ?
 - A. Preuves épidémiologiques.
 - B. Preuves sérologiques.
- II. — La vaccination est-elle dangereuse ?
 - A. Pour le vacciné.
 - B. Pour son entourage.
- III. — La technique de la vaccination peut-elle être perfectionnée ?
 - A. Virus-vaccination.
 - B. Séro-virus-vaccination.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

De tous les moyens dont la prophylaxie individuelle dispose pour lutter contre les maladies infectieuses, la vaccination est le plus efficace.

Les mesures générales de protection, même lorsqu'elles sont rigoureusement appliquées, n'assurent pas une éradication définitive de la maladie.

Quand la source de virus est intarissable, quand les vecteurs de ce virus ne peuvent tous être atteints, et qu'ainsi pèse constamment sur des milliers d'individus la menace d'une infection prête à les décimer, la vaccination est le *seul* moyen de protection efficace.

La zone d'endémicité de la fièvre jaune s'étend sur la côte Atlantique des deux continents américain et africain, entre les deux tropiques pour le premier et entre le 15° degré de latitude nord et le 10° degré de latitude sud pour le second.

De la côte, cette zone s'étend fort avant dans les terres. En ce qui concerne le territoire africain, le typhus amaril sévit avec prédilection dans le groupe des colonies de l'Afrique occidentale.

Le Sénégal et la Côte d'Ivoire, pour les possessions françaises; la Nigéria et la Côte de l'Or, pour les possessions anglaises, représentent la densité de morbidité la plus forte.

Mais la fièvre jaune est connue au-delà de ces frontières : au nord-est, elle atteint le Niger (Zinder); à l'est, les sources de l'Oubangui, dont elle suit le cours, et elle s'étend dans le bassin du Congo jusqu'à son embouchure. Dans le sud, elle atteint l'Angola.

Dans cette vaste région, où l'affection sévit à l'état spora-

dique, « le génie épidémique », qui préside à sa destinée, répand périodiquement le fléau.

Au cours de tels réveils, la morbidité atteint à 60 p. 100 des seuls sujets de race blanche.

Dans tous les cas, la morbidité n'est pas inférieure à 70 p. 100.

La dernière grande épidémie date de 1927-1928; elle a été l'occasion des progrès les plus décisifs dans l'étude de la maladie et sa prophylaxie.

Le 26 mai 1927, à Accra, le Docteur Adrian Stokes injecte à deux *Macacus sinicus* (crow monkeys) une partie du mélange du sang de trois jauneux de Larteh (Côte de l'Or). Les deux singes meurent huit et dix jours après cette inoculation.

A l'autopsie, leurs viscères présentent les mêmes lésions que ceux des malades ayant succombé à la fièvre jaune.

C'était la première fois qu'on réussissait à transmettre la maladie à un animal de laboratoire.

Il ne nous appartient pas de dire comment, ayant réussi à isoler le virus, A. Stokes précise qu'il s'agissait d'un virus infravisible, non cultivable sur les milieux usuels, filtrable, inoculable en série, etc.

Ajoutons que de telles inoculations furent facilement répétées et que le *Macacus rhesus* se révéla, dès les premières expériences, plus sensible au virus que le *Macacus sinicus*.

En juin 1927, à Lagos, un indigène du nom d'Asibi fournit du sang virulent, qui détermina la mort d'un macaque, dont le foie, prélevé à l'autopsie, fut conservé à l'état congelé et adressé aux laboratoires de Bahia, Rio-de-Janeiro et New-York.

En décembre de la même année, à Dakar, Mathis, Laigret et Sellards isolaient de la même manière le virus amaril. Ils inoculèrent à un macaque le sang d'un Syrien qui avait présenté une forme éphémère de la maladie. L'animal succomba à l'infection, son foie fournit un matériel virulent qui fut expédié aux laboratoires de Boston, Londres et Paris.

Le virus amaril, qui est actuellement manipulé dans les

différents laboratoires, provient exclusivement de ces deux souches, dites souche Asibi et souche française, qui sont entretenues par passage sur les singes réceptifs, ou, depuis la découverte de Theiler (1930), sur les souris inoculées par voie cérébrale.

C'est ce virus qui fournit le matériel que l'on inocule à l'homme pour l'immuniser.

La découverte de Stokes, qui permettait les plus fructueuses recherches, mérite qu'on s'y arrête pour d'autres raisons :

Quatre mois après sa première inoculation au macaque, ce savant réalisait une dernière expérience, mais cette fois avec son propre sang. Il était atteint par le mal auquel il succomba à Lagos, le 19 septembre 1927.

Quelques mois après lui, Hideyo Nogushi et Williams Young tombaient à Accra.

D'autres avec eux, moins illustres, et aussi dévoués, payèrent de leur vie les acquisitions qui nous permettent aujourd'hui de lutter avec de meilleures armes contre le typhus amaril.

*
* *

Nous tenons à évoquer ici le souvenir de nos camarades des troupes coloniales : les Docteurs Guillet, mort à Thiès en 1927, et Duris, mort à Zinder en 1934, victimes eux aussi de la fièvre jaune.

Nous dédions ce travail à leur mémoire.

HISTORIQUE

Le désir d'immuniser l'homme contre la fièvre jaune a été exprimé pour la première fois en 1881 par Carlos Juan Finlay (La Havane). Ce savant, s'inspirant des travaux de Pasteur, tâcha de provoquer *une forme bénigne de la maladie* qui laisserait le sujet réfractaire à une inoculation ultérieure.

Finlay, qui avait précisé le rôle des moustiques dans la transmission du typhus amaril, supposa qu'à partir de ces insectes on pouvait obtenir des inoculations à effet pathogène limité, et c'est ainsi qu'il soumit 104 patients à la piqûre d'un ou deux moustiques qui s'étaient gorgés du sang de jaunes de un à six jours auparavant. Sur les 104 « vaccinés », 17 présentèrent des réactions fébriles; parmi ces derniers sujets, 4 contractèrent dans la suite une forme éphémère de la maladie. Sur les 87 sujets qui ne réagirent pas à l'inoculation, 39 purent être suivis pendant quatorze ans; ils ne contractèrent pas la fièvre jaune.

Vingt ans après les essais de Finlay, la Commission américaine précisait pendant combien de temps le sang des jaunes était virulent et fixait le cycle d'évolution du virus dans l'organisme de l'hôte vecteur.

On pouvait donc juger rétrospectivement la vaccination de Finlay et conclure que, selon toute vraisemblance, la piqûre des moustiques chargés d'inoculer le virus amaril aux patients n'était pas virulente.

Cette vraisemblance cède à la certitude au moment où Guiteras en 1901, à La Havane, tenant compte de l'incubation minimum nécessaire au développement du virus dans le stégomya, soumit 23 volontaires à la piqûre d'un seul moustique nourri plus de douze jours auparavant sur un jauneux. Du fait de cette inoculation, 7 « vaccinés » contractèrent une fièvre jaune sévère qui se termina par la mort dans 3 cas.

Après cet essai désastreux, l'immunisation ne fut plus tentée jusqu'à 1918, époque à laquelle H. Nogushi accusa un spirochète (*Leptospira icteroïdes*) d'être l'agent causal du typhus amaril. A partir de ces germes, Nogushi prépara un vaccin et un sérum.

Quelques médecins de l'Amérique centrale (Récio et Agramonte, entre autres), convaincus que le typhus amaril était dû à un virus invisible, conclurent que la vaccination de Nogushi était mal fondée. Trois volontaires qui avaient reçu le vaccin spirochétien contractèrent une fièvre jaune heureusement curable à la suite de la piqure de moustiques infectés. Cet argument porté à la charge de la vaccination n'empêcha pas cependant le procédé de s'étendre, et près de 20.000 personnes furent ainsi inoculées.

L'inefficacité de cette méthode ne fut manifestement établie qu'au cours de l'épidémie de 1927-1928. Les vaccinés de Nogushi, tant en Amérique qu'en Afrique occidentale, furent atteints par la maladie, et la mortalité chez eux ne fut pas moindre que celle qui frappait les non-vaccinés. C'est d'ailleurs au cours de cette épidémie que Nogushi convint de son erreur. On sait comment à la même époque le virus amaril fut isolé par A. Stokes, qui réussit à l'inoculer au macaque.

A partir de cette découverte, la vaccination contre la fièvre jaune s'édifie sur des connaissances précises. On savait qu'une atteinte de fièvre jaune laissait après elle une immunité solide. Il semblait qu'en identifiant le virus qui cause la maladie on tenait du même coup le moyen de s'en préserver.

Cet espoir devait être déçu durant quelques années encore, car si, dans la plupart des infections immunisantes à germes visibles, la découverte du virus pathogène résout pour ainsi dire le problème de la vaccination, il n'en va pas de même quand la maladie est due à un *virus filtrable*. De tels agents pathogènes ne sont immunisants qu'à l'état vivant. Un virus filtrant tué ne vaccine pas.

Et comme, en connaissance de cause, il n'était pas possible

d'inoculer à l'homme, sans danger, le virus amaril vivant, on s'évertua dans différents laboratoires à atténuer ce virus au moyen d'agents physiques ou chimiques. En 1928, Hindle prépara un vaccin avec une émulsion de foie virulent de macaque mort de fièvre jaune, soumis à l'action du phénol et du formol. Au même moment, A. Pettit et G. Stéphanopoulo préparaient un « anavirus » formolé, puis un vaccin obtenu par vieillissement de produits virulents à la température du laboratoire.

En 1928-1930-1931, Beaurepaire-Aragao, Leimos-Monteiro, Davis, préparaient des vaccins chloroformés. Tous ces vaccins furent éprouvés sur des macaques avec des résultats quelquefois encourageants, mais toujours irréguliers.

En 1931, Chagas, à Rio de Janeiro, vaccine 5.000 personnes avec des préparations d'organes virulents soumis à l'action du phénol ou du formol. En fait, tous ces vaccins n'étaient *pas modifiés*, ils étaient vivants ou morts : vivants, c'est-à-dire virulents, ils immunisaient; morts, ils étaient dénués de tout pouvoir antigénique (O. Kell, 1930).

C'est pourquoi la plupart des auteurs refusèrent d'appliquer à l'homme une méthode qui ne l'immuniserait qu'au prix d'un risque redoutable.

Après cet échec des virus tués, on songea à employer le virus vivant, mais dont le pouvoir pathogène serait masqué par un sérum immunisé. En 1928, Pettit et Stéfanopoulo, Theiler et Sellards avaient montré que des macaques, inoculés avec des produits fortement virulents, résistaient à cette inoculation grâce à la protection que leur conférait un sérum immun.

Les animaux ainsi inoculés étaient résistants à la fièvre jaune pendant plusieurs mois. Ils avaient donc acquis une immunité active. B. Aragao réalisait, en août 1931, une série d'expériences analogues ; 5 macaques étaient protégés contre l'inoculation du virus amaril vivant par l'injection sous-cutanée six heures auparavant de 2 cm³ de sérum de convalescent. Les singes subissaient un à deux jours après cette

vaccination une nouvelle inoculation fortement virulente sans manifester le moindre trouble. L'immunité qui leur était ainsi conférée était contrôlée après six mois. Ici encore, et malgré la garantie effective apportée par le sérum dans ce procédé d'immunisation, la crainte de voir se manifester le pouvoir pathogène du virus amaril introduit à l'état vivant dans l'organisme s'opposa à l'application à l'homme d'une telle vaccination.

C'est la découverte de Theiler, publiée en juillet 1930, qui apporta aux biologistes le moyen décisif de réaliser l'immunisation anti-amarile chez l'homme : le virus amaril adapté au système nerveux de la souris avait perdu après plusieurs passages son pouvoir pathogène pour le macaque, tout en conservant ses propriétés antigéniques. Il apparut, dès la publication de Theiler, que le virus dont on pouvait disposer était à la fièvre jaune ce que le virus vaccinal était à la variole. Et sur cette acquisition nouvelle fut entreprise la vaccination moderne de la fièvre jaune. Le nouveau virus biologiquement modifié, qui passait pour avoir perdu toute virulence, fut employé vivant et pur par Sellards et Laigret pour la première fois à Tunis, le 11 novembre 1931, afin d'immuniser une démente justiciable de la pyrétothérapie. Aucune réaction, même la plus légère, ne suivit cette vaccination, qui laissa après elle une immunité solide.

Quelque temps avant, Kitchen et Llyod, qui avaient observé deux réactions sévères à la suite de l'inoculation accidentelle du virus de Theiler, employèrent pour vacciner l'homme un mélange de virus et de sérum immun.

Quelle que soit la technique employée, le principe est le même : inoculer à l'homme un virus *vivant biologiquement modifié*, ayant conservé le pouvoir antigénique spécifique du virus amaril. C'est à partir de cette découverte de Theiler que s'ouvre l'ère de la vaccination pratique contre la fièvre jaune. Tout ce qui précède, et que nous avons succinctement rappelé, appartient aux temps héroïques de l'histoire du typhus amaril.

CHAPITRE PREMIER

LE VIRUS DE THEILER

ADAPTATION DU VIRUS AMARIL A LA SOURIS PAR L'INOCULATION INTRACEREBRALE

On sait comment Adrien Stokes, en 1927, isola le virus amaril en l'inoculant au macaque.

D'autres animaux de laboratoire furent éprouvés. On les considéra comme réfractaires jusqu'au moment où, en 1930, Max Theiler découvrit la susceptibilité spéciale de la souris blanche.

La fréquence des accidents nerveux signalés au cours de la fièvre jaune humaine (Lasnet et Laigret, 1929) fut retenue par Theiler et orienta ses travaux. S'inspirant, d'autre part, des expériences d'Andervont, qui, en 1920, avait décrit la sensibilité de la souris blanche au virus herpétique inoculé par voie cérébrale, l'auteur entreprit d'éprouver les souris dans les mêmes conditions avec le virus amaril.

Il publia en juillet 1930 (*Annals of tropical Medicine and parasitology*) les premiers résultats de ses recherches. Le matériel qu'il inoculait aux souris blanches provenait du cerveau ou du sang de macaque mort de fièvre jaune à la suite d'une inoculation de virus de la souche française. Ces primo-inoculations déterminent la mort des souris 15 fois sur 20. Les décès s'échelonnent entre le premier et le trentième jour de l'inoculation. 5 souris sont autopsiées : 3 d'entre elles (qui avaient été sacrifiées à l'agonie les douzième, vingt et unième et vingt-deuxième jours) présentent des

lésions microscopiques d'encéphalite; les 2 autres ne montrent pas de lésions cérébrales.

Une des souris autopsiées, morte au douzième jour, a fourni à partir de son cerveau un matériel virulent qui, inoculé à 4 souris neuves, les a fait mourir d'encéphalite aux huitième et neuvième jours.

Les cerveaux des 2 autres souris sacrifiées à l'agonie (et non autopsiées) les dixième et onzième jours ont également permis la réinoculation de 6 souris neuves qui meurent aux huitième et neuvième jours.

A partir de ces expériences préliminaires, Theiler inocule en série des souris par voie intracérébrale; au fur et à mesure des passages de cerveau à cerveau, la maladie murine se précise dans ses symptômes, le temps de l'incubation se réduit et varie peu autour de huit jours. La survie des souris devient exceptionnelle.

Les mêmes expériences furent répétées dans tous les laboratoires avec les mêmes résultats.

C'est ainsi que M. Mathis et Martin Charpenel établissent au début de 1932 la première souche murine du laboratoire du Professeur Pettit à l'Institut Pasteur de Paris.

Le premier passage de la souris blanche est effectué à partir d'un cerveau de macaque mort de fièvre jaune authentique. Ce cerveau, conservé pendant cinq jours à la température de -15° C., fournit un broyat virulent qui, dilué au 1/10, est centrifugé à faible vitesse pendant dix minutes.

Deux gouttes du liquide qui surnage sont injectées dans le cerveau de 10 souris adultes bien portantes (la solution virulente a étéensemencée sur divers milieux, qui sont tous restés stériles). Neuf jours après l'inoculation, les 10 souris sont bien portantes. Le dixième jour, 3 souris sont sacrifiées à l'agonie, les cerveaux prélevés aseptiquement sont conservés à -12° C. pendant vingt-neuf jours, après lesquels deux des cerveaux sont dilués au 1/100 (en eau physiologique additionnée de 1/10 de sérum de lapin) et servant au passage suivant.

Deux gouttes de l'émulsion précédente sont injectées dans le cerveau de 13 souris dont une est agonisante le dixième jour.

Au 3^e passage, sur 19 souris inoculées, 4 meurent le septième jour, 2 le huitième, les 4 dernières le neuvième.

Dans la suite des inoculations, les auteurs observent comme Theiler que la période d'incubation devient fixe et que la mortalité des souris augmente.

1. — *La maladie de la souris. — Voies d'inoculation.*

INOCULATION. — Point d'injection : « A la partie postérieure du crâne, tout près de la ligne médiane. » (Theiler.) Après avoir badigeonné la région à l'alcool, on inocule, au lieu d'élection, deux gouttes ou mieux $1/32$ de centimètre cube (mesuré à la seringue tuberculine) d'une solution virulente de cerveau.

Réactions : Immédiatement après la piqûre, la plupart des souris témoignent d'une activité désordonnée avec convulsions généralisées ou limitées. Cette réaction dure quelques minutes, après quoi les animaux retrouvent leur aspect normal.

MARCHE DE LA MALADIE. — L'incubation silencieuse est courte, de un à trois jours. Les premiers signes que l'on observe sont une perte de l'activité des souris et le hérissément de la fourrure. Les manifestations nerveuses suivent de près ces premières altérations, l'arrière-train s'immobilise, l'animal se recroqueville et se terre. La mort survient en moyenne au septième jour après l'inoculation.

Après plusieurs passages, quand le neurotropisme du virus amaril est bien fixé, la mortalité des souris atteint 100 p. 100. Cependant, au cours des passages multipliés en grand nombre, on trouve des variations de virulence d'une même souche murine et, dans certains cas, la mortalité des souris descend à un taux très faible. De telles pertes de virulence sont fréquentes, mais généralement passagères.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE :

a) *Macroscopique.* — Dans la moitié des cas, Theiler a trouvé une hémorragie gastrique. Les ganglions lymphatiques sont généralement gros; ils présentent quelquefois des suffusions sanguines. Stéfanopoulo, en 1934, retrouve rarement l'hémorragie gastrique signalée par Theiler, et tout à fait

exceptionnellement les ecchymoses sous-cutanées décrites par Dinger. Les viscères abdominaux sont normaux, d'après Theiler. Stéfanopoulo, cependant, aurait trouvé dans quelques cas une dégénérescence graisseuse massive du foie, mais sans obtenir de produit virulent à partir de cet organe.

b) *Microscopique*. — 1° Lésions de l'encéphale : On trouve une prolifération de l'endothélium des vaisseaux et un manchon périvasculaire de mononucléés. Les cellules nerveuses présentent des inclusions nucléaires acidophiles analogues à celles qui ont été décrites dans le foie des macaques jaunes par Torres, Cowdry et Kitchen. Quelquefois, ces inclusions débordent du noyau dans le cytoplasme, qui se colore de ce fait en rouge vif par l'éosine et en rose pâle par le Giemsa.

2° Lésions de la moelle : On relève les mêmes altérations vasculaires, périvasculaires et cellulaires.

VIRULENCE DES DIFFÉRENTS ORGANES. — Les organes hautement virulents sont : le cerveau, la moelle, les nerfs et les capsules surrénales. Le cheminement centrifuge du virus dans le système nerveux de la souris est démontré par Theiler de la façon suivante : Au troisième jour de l'inoculation intracérébrale, la moelle est virulente, alors que les nerfs sciatiques et les surrénales ne le sont pas encore. Du quatrième au sixième jour, on trouve le virus dans tout le système nerveux, y compris les capsules surrénales.

Le foie, les reins, sont peu virulents, et pour Theiler la virulence même de ces organes est proportionnelle à leur richesse d'innervation.

Le sang n'est pas virulent (Theiler, Kitchen, Stéfanopoulo).

INOCULATION PAR LA VOIE PÉRITONÉALE :

a) *Chez la souris adulte*. — En règle générale, de telles inoculations sont infructueuses. Theiler, sur un grand nombre d'animaux éprouvés, n'en a trouvé que 2 qui aient réagi par une encéphalite. Dans les 2 cas, les cerveaux étaient parasités par un protozoaire (encéphalitozoon).

Dans les deux tiers des cas, cette inoculation intrapéritonéale rend les animaux réfractaires à une inoculation ultérieure par la voie cérébrale. Stéfanopoulo, en 1934, a pu vérifier, dans un grand nombre de cas, cette immunisation des souris. Il a, de plus, précisé la virulence du cerveau de souris inoculées intrapéritonéalement. Bien que les souris ne réagissent pas par une encéphalite manifeste, leur cerveau est virulent du premier au quatrième jour en moyenne. Pour que la maladie se manifeste, il faut qu'un traumatisme cérébral favorise la localisation de l'infection.

Le virus, dans ce mode d'inoculation, circulerait toujours dans le sang, où on peut le retrouver pendant plusieurs jours (Sawyer et Lloyd, 1931). Pour Theiler, cette virulence serait l'exception.

b) *Chez la jeune souris* (de moins de 14 jours). — Sur 34 souris éprouvées, Theiler avait obtenu par l'inoculation intrapéritonéale 30 décès par encéphalite. La marche de la maladie, après de telles inoculations, est la même que celle qui est consécutive à l'inoculation intracérébrale de la souris adulte.

L'examen des viscères abdominaux et du sang ne révèle ni davantage de lésions, ni plus souvent de virus que dans les autres cas (Theiler). Cliniquement et histologiquement, la maladie est la même, essentiellement nerveuse.

II. — *Adaptation du virus neurotrope au cobaye et au hérisson.*

A. — *Au cobaye.*

Le cobaye fournit un sujet d'études des plus édifiants, car l'inoculation à cet animal du virus amaril passé par la souris réalise un ensemble de lésions où se révèle l'unicité du virus.

Les travaux de Stéphanopoulo, datés de mars 1933 nous fournissent des renseignements précis à propos de cette inoculation.

INOCULATION INTRACÉRÉBRALE. — Au cinquième jour de l'inoculation apparaissent des phénomènes paralytiques qui débutent par un membre. La parésie s'étend rapidement et réalise une paralysie flasque soit du train antérieur, soit du train postérieur. Les signes nerveux se complètent par des tremblements. La température oscille autour de 39 et 40 degrés. L'animal reste couché et meurt dans le coma le huitième ou le neuvième jour de l'inoculation.

L'apparition et l'évolution des paralysies peuvent être plus rapides ou plus lentes suivant la virulence des inoculations. Chez le cobaye, cette variation de virulence est d'ailleurs plus grande encore que chez la souris.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE :

a) *Macroscopique.* — Les anses intestinales sont quelquefois hyperémiées. La muqueuse gastrique est souvent érodée et sanguinolente. Le melæna a été rencontré dans 4 cas par Stéfanopoulo. Les hémorragies du tube digestif ont d'ailleurs été décrites auparavant par Theiler, Kuczinski et Hohenadel, Dinger, Schöffner et Snyders. Le foie présente presque toujours l'aspect « chamois » (comme celui des macaques morts de fièvre jaune); cependant, un foie ainsi lésé ne s'est jamais montré virulent, ce qui, aux dires de Stéfanopoulo, complique l'interprétation des faits.

b) *Microscopique.* — Le foie présente une dégénérescence graisseuse massive.

Le cerveau, la moelle, présentent les mêmes lésions que chez la souris.

B. — Au hérisson.

Le hérisson d'Europe réagit à l'inoculation cérébrale par une encéphalite; mais, en plus, on trouve assez régulièrement à l'autopsie des animaux « des foyers de nécrose dans le foie avec des lésions de Councilmann et des inclusions nu-

cléaires. Des altérations dégénératives peuvent aussi se produire dans les tubes du rein, tandis que parfois on peut observer de petites hémorragies au niveau de la muqueuse gastrique » (Findlay et Clarke, 1934).

III. — *Unicité du virus amaril.*

En même temps que Theiler relate dans sa première publication les résultats de l'inoculation intracérébrale de la souris, cet auteur établit la preuve de l'unicité du virus amaril :

a) Le premier macaque fut inoculé dans le péritoine avec un cerveau de 3^e passage vingt-quatre jours après la création de la souche.

Le singe fut sacrifié mourant au cinquième jour de l'inoculation; l'autopsie mit à l'évidence des lésions typiques de fièvre jaune. Les examens microscopiques confirmèrent le diagnostic.

b) Un deuxième macaque fut inoculé avec du matériel virulent de 29^e passage, cent quatre-vingt-neuf jours après la création de la souche.

Aux sixième et septième jours, ce singe montre une élévation de température à 40°7, après quoi il redevient parfaitement normal.

Vingt-deux jours après l'inoculation du virus murin, ce même macaque se montre réfractaire à l'action d'un virus normal provenant d'un singe mort de fièvre jaune. Il ne réagit que par une élévation passagère de la température au troisième jour.

Dans la suite, de telles expériences furent multipliées, la notion établie par Theiler fut précisée, car cette unicité du virus amaril est le fondement même de la vaccination.

Les preuves qui l'appuient sont développées au cours de ce travail; elles en constituent implicitement l'objet.

CHAPITRE II

LES REACTIONS SEROLOGIQUES DE L'IMMUNITÉ ANTI-AMARILE

1. — *Le test de séro-protection intracérébral de la souris.*

Theiler, dès qu'il eut réalisé l'adaptation du virus amaril à la souris, s'attacha à démontrer que le sérum des singes qu'il avait inoculés avec ce nouveau virus protégeait la souris contre l'inoculation intracérébrale (immunité directe), et que le sérum d'anciens jaunes et d'hommes inoculés avec le virus murin jouissaient l'un et l'autre des mêmes qualités protectrices (immunité croisée).

A. — Immunité directe.

Dans la première série d'expériences qui est réalisée à cet égard, le virus que Theiler inocule intracérébralement à la souris blanche est un virus de 20^e passage.

Un lot de témoins reçoit le seul virus. Des 4 souris en expérience, toutes sont mortes le huitième jour d'encéphalite typique.

Un deuxième lot de 3 souris reçoit une inoculation cérébrale de ce même virus une demi-heure après avoir reçu dans le péritoine un 1/2 cm³ de sérum de singe immunisé contre la fièvre jaune par l'inoculation du virus neurotrope.

Sur 3 souris inoculées, 1 survit, 2 sont sacrifiées paralysées le huitième jour; elles présentent à l'examen des lésions d'encéphalite.

Un troisième lot subit une inoculation intracérébrale d'un mélange de virus et de sérum de macaque vacciné. Sur les 4 souris inoculées, 2 meurent tardivement d'encéphalite au dixième jour, 2 survivent.

Un dernier lot de souris est éprouvé avec le même mélange que précédemment, mais après que ce mélange a été abandonné à la température du laboratoire pendant une heure. Sur les 3 animaux ainsi inoculés, 1 meurt d'encéphalite le neuvième jour, 2 survivent.

En résumé, le même virus qui, inoculé seul intracérébralement à la souris, tue en moins de huit jours 4 animaux sur 4 éprouvés, n'en tue plus que 5 sur 10 quand il est inoculé avec un sérum de macaque vacciné.

Après ces essais préliminaires, sérum et virus sont toujours injectés ensemble dans le cerveau des souris.

Dans la deuxième série d'expériences, le virus inoculé est préparé de la façon suivante : Une dilution au 1/10^e dans l'eau physiologique et centrifugée à petite vitesse pendant dix minutes, la partie surnageant est seule inoculée; les cerveaux virulents provenaient de souris au 3^e passage. En somme, le matériel inoculé dans cette deuxième série d'épreuves était plus dilué que précédemment.

Les souris recevaient une injection intracérébrale du mélange à part égale de ce virus et du sérum étudié. Mais avant d'être inoculé, le mélange était resté à la température du laboratoire pendant vingt minutes, une heure, et deux heures. Parallèlement, on avait abandonné à la même température, et pendant le même temps, des mélanges du même virus avec des sérums n'ayant pas de propriétés immunisantes.

Trois lots de souris furent inoculées avec le virus neutralisé.

Trois lots de souris furent inoculées avec le mélange de virus et de sérum normal.

Les souris de ces trois derniers lots étaient toutes mortes d'encéphalite au huitième jour de l'inoculation.

Les souris inoculées avec le mélange de virus et de sérum immun réagissent de la façon suivante :

Le premier lot (mélange ayant séjourné vingt minutes à la température du laboratoire) comprend 4 souris : 1 est sacrifiée paralysée le douzième jour, 3 survivent.

Le deuxième lot (mélange déposé une heure à la température du laboratoire) comprend 4 souris : 1 meurt d'une infection étrangère au virus au troisième jour, 3 survivent.

Le troisième lot (mélange de deux heures) comprend également 4 souris : 1 meurt d'une infection étrangère au virus.

Au cinquième jour, 1 autre souris est sacrifiée paralysée, 2 survivent.

En résumé, l'action d'un virus normalement virulent pour la souris a été neutralisée complètement par un sérum immun 8 fois sur 12. Dans 2 cas, le virus a tué la souris, mais une fois avec un retard de quatre jours sur les délais habituels. Dans 2 cas enfin, les animaux en expérience ont succombé précocement d'une infection étrangère.

B. — Immunité croisée.

Dans une deuxième série d'expériences, Theiler fut amené à éprouver deux sérums humains; l'un provenait d'un sujet victime d'une inoculation accidentelle de laboratoire (T..., obs. V); l'autre provenait d'un sujet guéri de fièvre jaune spontanée (V...).

Pour l'épreuve, le virus est préparé par centrifugation d'une dilution virulente d'un cerveau au 40^e passage. La partie surnageant est seule employée, elle est inoculée à part égale avec le sérum à étudier.

Epreuve du sérum de T... (6 souris) :

2 souris meurent d'une infection intercurrente les deuxième et troisième jours;

3 meurent d'encéphalite les huitième et onzième jours;

1 survit.

Epreuve du sérum de V... (6 souris) :

4 meurent d'encéphalite les cinquième, sixième, huitième et dixième jours;

2 survivent.

Dans une contre-épreuve, 6 souris sont inoculées avec un mélange de virus et de sérum normal. Elles sont toutes mortes d'encéphalite au septième jour de l'inoculation.

A la même époque, Theiler éprouvait de la même manière des sérums prélevés sur des sujets guéris de fièvre jaune contractée en Afrique, au Brésil et en Colombie; dans tous les cas, la protection était incomplète, mais manifeste, si l'on comparait les résultats des épreuves pratiquées avec le sérum immun et ceux des inoculations du virus seul. Dès ce moment, l'auteur souligne que, toutes choses égales du côté du sérum à éprouver, les résultats varient avec l'origine des cerveaux et avec la concentration des suspensions virulentes.

La variété de virulences au moment du prélèvement des cerveaux des souris se trouve donc établie dès le début des travaux relatifs au virus murin. L'importance d'une telle notion, déjà considérable lorsqu'on veut juger avec un peu de précision des qualités d'un sérum immun, devient capitale lorsque cette notion trouve son application dans la vaccination elle-même.

Theiler publia encore, en mai 1931, sous la rubrique : *Test de protection intracérébrale de la souris*, une nouvelle série d'expériences réalisées exclusivement avec des sérums de 15 sujets guéris de typhus amaril.

Tous ces sérums avaient été préalablement éprouvés par Sawyer sur le macaque; chaque fois, le singe résistait à l'action d'une inoculation fortement virulente de virus normal.

*
* *

Theiler prépare des mélanges à parts égales d'un échantillon de chacun de ces sérums avec une solution virulente préparée à partir de cerveaux virulents de plus de 100 passages. Ces mélanges sont inoculés intracérébralement à des souris qui survivent dans une proportion de 8/10, alors que les animaux témoins inoculés avec un mélange du même virus et de sérum normal sont tous morts d'encéphalite au huitième jour.

Ainsi s'affirme de plus en plus l'immunité commune d'un sérum à l'égard à la fois du virus amaril normal et du virus de souris.

Sans doute, de prime abord, cette immunité semble imparfaite, mais si l'on veut bien tenir compte de la quantité relativement importante du virus neutralisée par le sérum, on mesurera la sévérité de l'épreuve, qui, du même coup, apparaîtra plus édifiante dans ses résultats.

Theiler inoculait aux souris des solutions virulentes fraîches au 1/10, au 1/20 ou au 1/100. La richesse virulente de ces solutions lui était inconnue. Ce que l'on a appris depuis permet de supposer qu'elle était considérable et que les insuccès partiels s'expliquent de ce fait. D'ailleurs, dans chacune des expériences, Theiler avait la preuve que le virus qu'il employait était régulièrement et fortement virulent, puisque, dans chaque lot de contrôle, les souris mouraient au plus tard le huitième jour de l'inoculation. Et c'est pour cela que le fait d'avoir obtenu des paralysies tardives et même, à plus forte raison, quelques protections parfaites, témoigne d'une action *qualitative* certaine du sérum éprouvé.

Mais, pour permettre une interprétation sans équivoque du test de souris, il fallait :

- 1° Réaliser régulièrement, avec un même virus, l'immunité du singe à l'égard de la fièvre jaune et l'immunité de la souris à l'égard du virus murin;
- 2° Ajuster réciproquement dans l'épreuve le virus et le sérum.

1° Protection avec un même sérum du singe contre le virus normal et protection de la souris contre le virus de Theiler.

Nous avons vu que, dès 1930, Theiler avait identifié à un sérum d'ancien amarillique celui d'un sujet inoculé accidentellement avec un virus neurotrope. Le bien-fondé d'une telle identification a été établi par la suite au cours de multiples expériences :

Chez le singe : Par Sellards et d'autres, plus récemment par Stéfanopoulo, qui, au cours d'une revue d'ensemble sur les propriétés du virus amaril, rapporte des expériences relatives aux propriétés immunologiques des sérums de 12 singes ayant survécu à une infection amarillique normale. Dans tous les cas, les sérums donnaient un test de protection intracérébral de la souris positif, et les mêmes macaques supportaient tous sans dommage l'inoculation sous-cutanée intrapéritonéale et intracérébrale du virus de Theiler.

13 autres macaques, inoculés avec du virus neurotrope (21^e à 22^e passage), donnent tous, sauf 1, un test de protection positif pour la souris; parallèlement, ils résistent à l'inoculation du virus amaril normal.

Chez l'homme : Au cours d'inoculations accidentelles avec le virus de souris, Berry et Kitchen éprouvent le sérum de leurs malades (obs. III et IV) chez le macaque. Chaque singe reçoit sous la peau 1 cm³ de sérum de convalescent par kilo de poids somatique; puis, six heures environ après, 0,4 cg. de virus normal; les animaux en expérience survivent alors que ceux qui n'ont reçu que le virus meurent de fièvre jaune typique.

Les souris inoculées intracérébralement avec le virus murin sont protégées parfaitement par le sérum des convalescents, alors que les témoins meurent tous d'encéphalite.

Au cours des premières vaccinations (1930 à 1933), Laigret protège les macaques par l'injection intrapéritonéale de 3 cm³ de sérum des vaccinés contre l'inoculation pratiquée deux heures plus tard de 1 cm³ d'une suspension de foie virulent dilué au 1/5. Des épreuves plus sévères ont été réalisées avec succès avec l'injection de 1 cm³ d'immun-sérum.

Des souris inoculées intracérébralement avec le mélange de virus et de sérum ont régulièrement résisté, alors que les témoins mouraient du huitième au quinzième jour.

D'autres exemples pourraient être cités encore; ils sont tous convaincants et conduisent à conclure que :

Un sérum qui donne un test de protection de la souris positif provient d'un organisme réfractaire au virus normal de la fièvre jaune.

Dans une publication de Stéfanopoulo, il semble qu'on trouve une exception à la règle formulée ci-dessus : Un macaque inoculé avec un virus murin de 161^e passage fournit un sérum qui, au quatorzième jour de l'inoculation, donne un test de protection positif, et cependant le singe réagit par une fièvre jaune mortelle à l'inoculation de l'épreuve.

Le fait de la réceptivité du macaque au quatorzième jour d'une vaccination ne constitue pas en soi une preuve de l'échec de cette vaccination. On sait qu'à cette date l'immunité n'est pas forcément établie. Mais même le fait que le singe ait contracté une fièvre jaune à la suite d'une inoculation d'épreuve, alors que son sérum protégeait la souris, n'entraîne pas, sans discussion, la déchéance du test intracérébral.

C'est qu'en effet la protection conférée à la souris par un sérum immun peut être de bonne ou de mauvaise qualité, elle peut être faible ou forte.

A une séro-protection forte de la souris correspond une immunité certaine de l'organisme qui a fourni le sérum.

A une séro-protection faible correspond une immunité fragile ou en train de s'établir.

Ces observations conduisent tout naturellement à ajouter à la valeur qualitative du test de Theiler la précision quantitative dans la mesure où elle peut être atteinte en biologie.

2° Ajustement du virus et du sérum
(titrage d'un sérum protecteur).

Laigret schématise ainsi le test intracérébral tel qu'il est pratiqué dans la plupart des laboratoires :

« L'épreuve consiste à mélanger une certaine quantité de virus au sérum dont on veut mettre en évidence le pouvoir protecteur, puis à inoculer ce mélange par voie cérébrale à des souris. Il faut que les témoins s'infectent à coup sûr, et que si le sérum est protecteur les animaux d'épreuve résistent. La condition nécessaire et suffisante pour réussir est d'utiliser une quantité de virus connu. On y parvient en se servant d'une suspension glycérinée titrée d'avance.

» Je suppose qu'on opère avec une suspension glycérinée mortelle pour la souris jusqu'à la dilution 1/10.000. Prélever 0,5 cm³ de cette suspension. La diluer à 1/500 en eau physiologique, puis l'amener à 1/1.000 par addition des parties égales du sérum à éprouver. Dans un deuxième tube, préparer de même une suspension à 1/5.000 du virus qu'on amène à 1/10.000 par addition de sérum. Pour les témoins, préparer les dilutions à 1/1.000 et 1/10.000 de virus dans un sérum normal de cheval ou de lapin.

» Agiter les tubes pendant quelques secondes pour assurer l'intimité des mélanges et inoculer leur contenu par voie cérébrale à des souris (seringue tuberculine 1/32 de centimètre cube par animal). Pour chaque dilution, inoculer au moins 2 souris. Observer celles-ci quinze jours. Si les souris d'épreuve survivent, le pouvoir protecteur est démontré. Les témoins se paralysent et meurent entre le cinquième et le quinzième jour. Le pouvoir protecteur est faible si la protection n'a été opérante que contre la suspension la plus diluée, fort si la suspension la plus riche a été elle-même neutralisée. Dans le premier cas, il est facile de calculer que 1 cm³ de sérum contient 64 unités protectrices; dans le second, au moins 640. C'est ce pouvoir protecteur fort qu'il faut exiger des sérums après la vaccination. »

II. — *Le test de protection intrapéritonéal de la souris.*

Guidés par les premières publications de Theiler, et désirant obtenir des protections plus régulières avec les sérums immuns, Sawyer, Kitchen et Lloyd fixèrent une technique modifiée du test de protection de la souris. Il s'agit du test de protection intrapéritonéal (déc. 1931).

On sait que la souris blanche, inoculée par voie péritonéale, ne réagit d'aucune manière, à moins qu'une lésion cérébrale traumatique, parasitaire ou infectieuse, ne détermine la localisation du virus et déclenche l'encéphalite amarile mortelle.

Sawyer, Kitchen et Lloyd inoculèrent donc par voie péritonéale le mélange de virus (0,2 cm³ d'une solution à 1/10) et de sérum à éprouver (0,4 cm³); le traumatisme cérébral est réalisé par l'inoculation *in situ* de 0,03 cm³ d'une solution avec :

Amidon	2 p. 100
NaCl	7 p. 1.000

Si le sérum est protecteur, la souris survit à l'épreuve; si le sérum est dépourvu d'immunisines, la souris succombe régulièrement à l'encéphalite. Les souris témoins subissent dans les mêmes conditions l'injection de virus mélangé avec un sérum normal, ainsi que le traumatisme localisateur; elles meurent toutes paralysées huit à dix jours après l'inoculation.

Ce test intrapéritonéal a naturellement la même signification que celui indiqué par Theiler. Les auteurs qui en ont dès le début fixé la technique l'ont appliquée surtout aux recherches épidémiologiques.

En novembre 1933, ils avaient éprouvé 3.274 sérums; chaque fois, les données sérologiques concordaient avec les données épidémiologiques.

Au Brésil, par exemple, dans une localité à altitude élevée où la fièvre jaune a toujours été inconnue, 221 sujets furent soumis au test intrapéritonéal. Tous furent négatifs. Au contraire, dans deux autres localités, où la fièvre jaune a été souvent reconnue, sur 110 sérums examinés, 90 donnèrent un test positif.

Avec des sérums provenant d'A.O.F., les résultats furent aussi significatifs.

Pour ces raisons, les auteurs accordent au test qu'ils préconisent la plus grande valeur pratique : essentiellement celle de déterminer les zones d'endémicité amarile et de prouver l'immunité des sujets qui fournissent un sérum protecteur.

CHAPITRE III

ACTION DU VIRUS DE THEILER SUR LE SINGE

Dans les expériences fondamentales de Theiler rapportées au chapitre I on trouve une première indication de la modification profonde du virus de la fièvre jaune après passages sur le cerveau des souris :

Un macaque inoculé sous la peau avec une dilution de cerveau virulent au 3^e passage réagissait par une fièvre jaune.

Un autre macaque inoculé sous la peau avec un matériel virulent du 29^e passage survivait à l'inoculation et résistait vingt-deux jours après à l'injection sous-cutanée de sang fortement virulent provenant d'un autre singe mort de fièvre jaune.

Cette expérience réalisait chez l'animal la première vaccination anti-amarile avec le virus de Theiler.

L'espoir était né de pouvoir disposer d'un virus modifié *dans sa virulence* et conservant encore ses *propriétés antigéniques*. A partir de cette acquisition nouvelle, dans les différents laboratoires où la fièvre jaune est à l'étude, on tâcha de préciser les propriétés biologiques du virus de Theiler. Deux questions étaient capitales à résoudre :

1° Le virus modifié a-t-il définitivement perdu sa virulence;

2° Le virus immunise-t-il contre la fièvre jaune?

1. — *Virulence du virus de Theiler pour le singe.*

A. — Inoculation directe au singe du cerveau de souris virulent par les différentes voies.

VOIE SOUS-CUTANÉE. — C'est celle qui semble la plus importante à éprouver puisqu'elle représente le mode de vacci-

nation proposée pour l'homme. Dans l'ensemble des expériences, les résultats sont favorables, c'est-à-dire que l'inoculation de virus modifié n'entraîne pas, en règle générale, de réaction apparente chez les animaux éprouvés. Le nombre de passages nécessaires à modifier définitivement le virus est difficile à préciser. Jusqu'au 20^e passage, le virus murin récupère dans presque tous les cas son pouvoir pathogène initial.

Dans les nombreuses inoculations de Stéfanopoulo, on trouve deux inoculations négatives avec des virus de 14^e et 17^e passage. Du 20^e au 40^e passage, le virus donne encore quelquefois la fièvre jaune au macaque. Des cerveaux de 20^e, 21^e et 27^e passages ont déterminé une maladie typique mortelle. Après le 40^e passage, les inoculations positives sont exceptionnelles (on trouve 1 cas de fièvre jaune avec un virus de 46^e passage [Stéfanopoulo] et 1 cas de Theiler avec un virus de 42^e passage).

Ainsi, la perte de virulence du virus amaril fixé sur le système nerveux de la souris est certaine, et bien qu'on ne puisse préciser rigoureusement à partir de quel moment cette mutation est définitive, on admet, pour disposer d'une marge de sécurité assez grande, qu'après 100 passages sur cerveau de souris, le virus ne peut plus retrouver par une *première inoculation* au singe son pouvoir pathogène initial.

Il est certain que pas un des macaques éprouvés jusqu'à ce jour avec des cerveaux virulents de 100 passages et plus, inoculés sous la peau, n'a réagi par une maladie apparente révélant des qualités pathogènes anciennes du virus amaril.

Par contre, les affinités nouvelles du virus se sont traduites deux fois par une encéphalomyélite clinique et anatomique : Stéfanopoulo et Mollaret signalent, en décembre 1934, 1 cas de maladie encéphalique tardive; Findlay publie à la même époque 1 cas d'encéphalite chez un macaque inoculé avec une solution de virus murin atténué et titrant moins de 16 U.S.

En dehors de réactions aussi manifestes et — d'ailleurs exceptionnelles, la température, qui s'élève le 6^e et le 7^e jour, traduit quelquefois l'infection; quant à la localisation même de l'infection sur le système nerveux, elle pourrait, même

dans les cas silencieux, être mise en évidence par l'examen du liquide céphalo-rachidien. Mollaret et Stéfanopoulo trouvent régulièrement une augmentation du taux de l'albumine et du nombre des cellules. Voici un exemple de leurs résultats :

	Albumine.	Leucocytes.
Avant l'inoculation	0,15	7,2
Quinze jours après l'inoculation ..	0,65	50
Dix-huit jours après l'inoculation ..	1 g.	67,2

Circulation du virus dans le sang. — Le virus circule dans le sang des macaques à partir de la dix-neuvième heure après l'inoculation jusqu'au douzième jour (Mathis). Quelquefois, le virus n'apparaît que le deuxième jour.

Dans les expériences de Stéfanopoulo, le virus n'a pas été retrouvé dans le sang après le sixième jour pour le virus du 20^e au 40^e passage, et pas après le quatrième jour pour les virus du 145^e au 229^e passage.

Dans les expériences de Findlay, le virus circulait dans le sang des macaques du deuxième au huitième jour.

VOIE INTRAPÉRITONÉALE. — L'inoculation intrapéritonéale a été souvent pratiquée soit seule, soit pour compléter une inoculation sous-cutanée. Ce mode d'inoculation n'agit pas différemment de l'inoculation sous-cutanée pratiquée seule.

VOIES INTRAMUSCULAIRE, INTRATESTICULAIRE. — Elles conduisent aux mêmes résultats que les voies sous-cutanée ou intrapéritonéale.

VOIE INTRACÉRÉBRALE. — Elle a été utilisée chez le singe en application de la découverte de Theiler. Le macaque réagit constamment à ce mode d'inoculation par une encéphalomyélite clinique et anatomique. Le type de réaction est le suivant (Stéfanopoulo) :

Matériel inoculé, souche F, 137^e passage.

A partir du troisième jour, l'animal paraît malade; au quatrième, la température monte; au cinquième jour s'installe une paralysie du membre supérieur gauche, la fièvre est élevée.

Les sixième et septième jours, la paralysie s'étend aux autres membres, réalise une quadriplégie avec tremblements. L'animal reste couché sur le flanc immobilisé et meurt hypothermique le huitième jour de l'inoculation intracérébrale.

L'autopsie et l'examen histologique ne révèlent aucune lésion du foie ou des reins. Le cerveau et la moelle présentent des lésions d'encéphalomyélite avec gaine périvasculaire et inclusions nucléaires décrites chez la souris.

Le nombre des inoculations ainsi réalisées dans les différents laboratoires est considérable. Les résultats sont toujours les mêmes, l'évolution des signes cliniques est fixe, l'incubation varie de quatre à neuf jours suivant la souche employée et la quantité de virus inoculé.

Circulation du virus dans le sang. — Ici, la présence du virus dans le sang est exceptionnellement révélée. Ce qui se passe chez le singe est parallèle à ce qui se passe chez la souris. Les organes hautement virulents sont : le cerveau, la moelle, la rétine, les surrénales (Lloyd et Penna). Pour ces auteurs, le sang ainsi que les viscères abdominaux seraient constamment dépourvus de virus.

B. — Retour du virus de Theiler à la virulence naturelle.

RÉCUPÉRATION IMMÉDIATE PAR PRIMO-INOCULATION. — Cette récupération ne s'est jamais réalisée au cours des inoculations sous-cutanées.

Mais par la voie cérébrale quelques auteurs ont pu observer des réactions qui sortent du cadre du neurotropisme : Beaurepaire-Aragao signale l'infection mortelle par fièvre jaune de deux macaques inoculés avec du virus qui comptait plus de 200 passages.

Stéfanopoulo publie 1 cas d'hépatonéphrite amarile coexistant chez un macaque avec une encéphalite consécutive à une inoculation intracérébrale de virus du 161^e passage.

On trouve enfin deux cas de viscérotropisme exclusif à la suite de deux inoculations intracérébrales (Lloyd et Penna, 1932).

RÉCUPÉRATION APRÈS PASSAGE :

1° *Par l'homme et le singe.* — La première démonstration de cette récupération nous est fournie par Berry et Kitchen, qui analysent dans leur publication 2 cas d'infections accidentelles dues au virus neurotrope (Cf. obs. II et III de la thèse).

Le sang d'un de ces malades a permis de réaliser un retour au viscérotropisme dans les conditions suivantes : Le sang du patient (W. L...) est prélevé aux premier, quatrième et cinquième jours de la maladie. Le premier macaque inoculé avec le sang du premier jour réagit par de la fièvre, et une immunité secondaire. A partir du sang de ce singe, 3 autres macaques sont inoculés en série. Tous trois réagissent par de la fièvre et se montrent ultérieurement résistants à une injection de virus normal (souche Asibi). Avec le sang du quatrième jour, un premier macaque inoculé réagit toujours par la seule hyperthermie et se montre résistant à l'inoculation d'épreuve. Le sang de ce macaque est inoculé à un deuxième singe qui, lui encore, ne réagit que par la fièvre, mais son sang inoculé à un troisième animal détermine chez ce dernier *une fièvre jaune manifeste* et mortelle en cinq jours. L'autopsie de cet animal révèle les lésions caractéristiques de la maladie expérimentale. Rappelons que la source du contagé était un virus murin de plus de 130 passages.

Findlay, dans une expérience récente, a réalisé méthodiquement le retour à sa virulence naturelle du virus de Theiler. L'auteur inocule directement ce virus neurotrope dans le foie du macaque. Lors des premières inoculations hépatiques, le singe ne réagit que par des lésions locales rappelant l'hépatite amarile; dans la suite des inoculations, les lésions hépatiques s'étendent. Plus tard, les lésions débordent du foie sur les autres viscères, et l'inoculation réalise à ce moment une fièvre jaune typique (foie chamois, vomito negro dans l'estomac, suffusions sanguines diverses, néphrite). Le virus ainsi récupéré est transmissible en série. Findlay, reprenant ce virus, l'adapte à nouveau au cerveau de la souris et ferme ainsi le cycle de mutation du virus, apportant encore une preuve de son unicité.

2° *Par les stégomyies*. — Il est important de savoir si, puisant le virus de Theiler dans un organisme infecté ou sur du matériel virulent, les *Aedes* peuvent lui restituer ses qualités viscérotropes, et de cette façon provoquer par leur piqure l'apparition de la fièvre jaune chez un sujet sensible.

— Dinger (1931) expérimente avec un virus de 10^e et 12^e passages que les moustiques puisent sur un tampon virulent. Les *aedes* piquant un macaque lui transmettent une fièvre jaune mortelle.

— Davis, Lloyd et Frobisher (1932). Des macaques sont piqués par des *aedes* de vingt-quatre à quarante-huit heures après l'inoculation du virus de Theiler comptant de 149 à 181 passages (au moment de la piqure, le sang était fortement virulent, ainsi que le prouvent les inoculations à la souris).

Ces insectes, entretenus dans des élevages à 28° C. pendant le temps nécessaire à l'évolution du virus dans leur organisme, sont mis à piquer 13 macaques neufs. Deux réagissent par de la fièvre, et sont réfractaires par la suite à une inoculation d'épreuve avec du virus normal. Les autres singes ne sont pas infectés par les moustiques, et ne témoignent d'aucune immunité. En plus, la preuve a été faite que les moustiques s'étaient réellement infectés, puisque leur broyat a déterminé l'encéphalite chez 6 souris inoculées intracérébralement.

— Maurice Mathis vaccine 2 macaques (M. R. 203 et M. R. 204) avec 4 cm³ d'une solution au 1/100 de cerveau virulent au 140^e passage. Les macaques éprouvés avant leur vaccination donnaient un test de séro-protection négatif. Le sang des animaux vaccinés est peu virulent le lendemain de la vaccination, ainsi qu'en témoignent les inoculations à la souris : Pour le macaque 203, 4 souris meurent sur 17; pour le macaque 204, 3 souris meurent sur 14. Pour les 2 macaques, le sang prélevé les deuxième, septième, douzième jours tue par encéphalite la moitié des souris inoculées.

Le macaque 203 est piqué le lendemain de la vaccination par 20 femelles d'*aedes argenteus* (issues d'œufs envoyés de Dakar). Après quoi, les insectes sont remis à l'élevage à 28 degrés. Deux macaques neufs piqués par ces insectes seize et vingt et un jours après le repas supposé infectant ne réagissent d'aucune manière, le sang des singes éprouvés n'avait pas davantage acquis le pouvoir protecteur.

Un mois après le repas présumé infectant, les femelles d'*aedes* sont chloroformées, 18 sont en bon état, elles sont broyées au mortier; le broyat dilué dans l'eau physiologique additionnée de sérum de lapin est inoculé à 2 singes, qui ne réagissent ni par une maladie, ni par l'acquisition de l'immunité, et à 18 souris, dont 1 seule succombe le septième jour, mais sans symptôme d'encéphalite.

— Stéfanopoulo (1934) : dans une première expérience, des *aedes* se gorgent du sang de deux macaques inoculés avec du virus neurotrophe de 21^e passage. Ces insectes sont reportés sur 2 macaques neufs, dix-sept et vingt-deux jours après le repas présumé infectant; à la suite de ces piqures, les singes acquièrent une immunité mise en évidence par le test de séro-protection et par leur résistance à une inoculation de virus amaril normal.

A la même époque, Stéfanopoulo expérimente avec un virus adapté depuis plus longtemps à la souris dans les mêmes conditions que précédemment. Le virus compte 147 passages. Les essais de transmission sont infructueux.

Deux singes neufs piqués par les moustiques présumés infectés n'acquièrent ni maladie ni immunité.

Afin de multiplier les chances d'infection des moustiques, dans une dernière expérience, Stéfanopoulo nourrit des *aedes* d'un même lot, à des reprises différentes, sur 3 macaques inoculés avec des virus de 171^e passage. Ces insectes sont reportés sur 4 macaques neufs du douzième au trente et unième jour après le repas présumé infectant.

A la suite de ces piqûres, les singes n'ont réagi ni par une maladie, ni par l'immunité.

En ce qui concerne la récupération éventuelle du pouvoir pathogène normal du virus à partir des vaccinés, Mathis, Durieux et Advier ont expérimenté dans 3 cas sous une latitude favorable (Dakar).

Trois sujets sont vaccinés avec du virus de 140^e passage à raison de 1 cm³ d'une solution au 1/500 et ne présentent aucun malaise. Le sérum des 3 patients éprouvé avant la vaccination ne témoignait d'aucun pouvoir protecteur; éprouvé après, le sérum ne donne un test franchement positif que pour un seul vacciné. Les vaccinés sont isolés ainsi que les macaques, que l'on soumettra à la piqûre des moustiques. De 30 à 40 *Aedes* se gorgent du sang des vaccinés le lendemain de la vaccination, et ils sont portés sur des macaques réceptifs treize, quatorze, quinze, vingt, vingt et un, vingt-deux, vingt-trois et vingt-cinq jours après la piqûre.

Les singes ne réagissent dans aucun cas ni par la maladie, ni par l'immunité.

Au cours de la Mission africaine, Laigret, Mathis et Durieux ont nourri chaque jour, pendant vingt jours, des lots différents de moustiques sur des vaccinés de Dakar. Les moustiques ont été reportés sur des hommes non vaccinés. Finalement, ils ont été broyés et inoculés au macaque.

Ni les hommes, ni les singes n'ont été malades, et ils n'ont pas non plus été immunisés.

II. -- *Propriétés immunisantes du virus de Theiler chez le singe.*

A la suite de Theiler, qui réalise en 1930, comme nous l'avons rapporté, la première vaccination du singe au moyen du virus adapté à la souris, on multiplia dans tous les laboratoires les expériences destinées à éprouver la valeur antigénique du virus murin. Les résultats en sont uniformes. Il serait monotone de les détailler. Pour en donner un exemple, choisissons au hasard des publications une expérience réa-

lisée au laboratoire du Professeur Pettit, de l'Institut Pasteur de Paris :

Le macaque (M. R. 113) est inoculé par voie sous-cutanée avec 1 cm³ d'une solution au 1/10 de cerveau virulent au 229^e passage. Il ne réagit aucunement. Son sang, prélevé le 36^e jour de la vaccination, donne un test de séro-protection positif. Le 63^e jour, le macaque reçoit sous la peau une émulsion de foie virulent d'un singe mort de fièvre jaune. Il survit à cette réinoculation sans réagir. Le 76^e jour, une inoculation intracérébrale, avec un virus de souris du 193^e passage, n'infecte pas l'animal.

Connaissant la sensibilité exquise du macaque au virus normal de la fièvre jaune et au virus neurotrope inoculé par voie cérébrale, on est amené à conclure à l'indiscutable immunisation d'un animal traité comme il vient d'être dit.

Les exemples de telles immunisations pourraient être infiniment multipliés. Il y a là une règle qui souffre sans doute peu d'exceptions. A cet égard, nous trouvons dans l'ensemble des publications une seule expérience dans laquelle l'immunité n'ait pas été réellement acquise :

Stéfanopoulo (*Ann. J. P.*, mai 1934) inocule le macaque M. R. 59, par voie sous-cutanée avec un virus de 161^e passage. Son sérum, prélevé le 14^e jour, donne un test de protection de la souris positif, et cependant le singe, inoculé sous la peau le lendemain (15^e jour de la vaccination) avec une dilution de foie virulent, meurt de fièvre jaune typique le neuvième jour de cette inoculation d'épreuve.

Ce qui est intéressant dans cette observation, c'est la discordance des résultats du test de séro-protection et de l'inoculation d'épreuve. Au moment où nous étudions en détail le test de protection, nous étions amené à conclure qu'il avait la valeur d'un test d'immunité; cette valeur se fonde d'ailleurs sur un très grand nombre d'expériences réalisées soit chez l'animal, soit chez l'homme, et dans lesquelles un sérum, qui donne un test de protection positif protège également le macaque contre le virus amaril normal. Cet exemple, dans lequel nous trouvons le test de protection en défaut, a été interprété à sa place, et nous ne nous y arrêtons maintenant que pour souligner le caractère exceptionnel d'un échec de la vaccination chez le macaque.

VALEUR DE L'IMMUNITÉ.

Apparition de l'immunité. — Dans tous les cas de vaccination réalisée chez le macaque, l'inoculation d'épreuve était particulièrement sévère. On sait (Pettit) que 1 milligramme de foie virulent dilué suffit à déclencher une fièvre jaune mortelle chez le singe, et même, d'après A. W. Sellards et Hindle, 1/10 de milligramme de foie contient souvent assez de virus pour déterminer la maladie mortelle du macaque. Or, pour la vérification de l'immunité, l'inoculation d'épreuve représentait des quantités de foie virulent congelé variant de 1 à 2 grammes. Toutes choses égales du côté de la virulence des produits employés, on peut donc conclure à la bonne qualité d'une immunité aussi sévèrement éprouvée. La même technique de contrôle nous fixe sur la date de l'apparition de l'immunité. De l'ensemble des expériences, il résulte qu'on ne peut considérer la résistance comme solidement acquise avant quinze jours. Pratiqués plus tard et parallèlement, le test de séro-protection de la souris et l'inoculation de virus normal de la fièvre jaune témoignent régulièrement de l'immunité forte acquise par les animaux : nous relevons des inoculations d'épreuve sans réaction au 68°, 70°, 100°, 106°, et, date extrême (Stéfanopoulo), 245° jour de la vaccination.

Contrôlée dans ce dernier cas après le huitième mois, l'immunité avait fléchi, ainsi qu'en témoignait la protection imparfaite des souris et aussi la réaction fébrile du singe au moment de la réinoculation avec présence de virus dans le sang le quatrième jour. Cette réinoculation de contrôle a eu pour effet de renforcer l'immunité fléchissante.

Durée de l'immunité. — Quant à la durée de l'immunité conférée au singe par l'inoculation du virus de Theiler, elle est mal déterminée du fait de la mauvaise conservation de ces animaux qui, dans nos climats, meurent de tuberculose, de pneumonie, ou d'une autre infection intercurrente qui coupe court à l'expérimentation. Néanmoins, on peut retenir que,

dans tous les cas, l'immunité était encore solide trois mois après la vaccination.

Relations entre l'apparition de l'immunité et la virulence du sang des macaques. — Nous avons vu que, dans la règle, le virus de Theiler inoculé au macaque était facilement retrouvé dans le sang si l'injection avait été sous-cutanée, et qu'on ne le retrouvait qu'exceptionnellement si l'injection avait été intracérébrale. La vaccination qui use de la voie sous-cutanée devait donc introduire le virus dans la circulation des singes éprouvés.

Pour Findlay, cette présence du virus dans le torrent circulator est la condition indispensable de la détermination de l'immunité lorsque la vaccination use du virus seul. Et c'est dans ces conditions que l'auteur expérimente sur 6 macaques avec les vaccins préparés suivant la méthode de Laigret.

Chacun des animaux reçoit, à vingt jours d'intervalle, les trois injections de vaccins de virulence croissante : la 1^{re} correspond à moins de 16 doses minima mortelles pour la souris; la 2^e à 16 doses minima mortelles; la 3^e, à 160.

— Les macaques 1, 3, 4 et 5, inoculés avec le 1^{er} vaccin, donnent un sang virulent du deuxième au huitième jour de la vaccination. Dix-neuf jours après cette inoculation, les singes témoignent de leur immunité (test de séro-protection positif de la souris).

Après l'inoculation du 2^e vaccin, les singes n'ont fourni à aucun moment de sang virulent.

— Les macaques 2 et 6 n'ont pas fourni de sang virulent après la 1^{re} inoculation; ils n'ont pas non plus acquis l'immunité (test de séro-protection négatif).

Après l'inoculation du 2^e vaccin, le virus est retrouvé dans le sang, et l'immunité est acquise à la suite de cette injection.

CHAPITRE IV

POUVOIR PATHOGENE DU VIRUS DE THEILER POUR L'HOMME

L'étude des 3 cas d'infection de laboratoire connus à ce jour et celle des réactions observées au cours de la vaccination contre la fièvre jaune permettent de définir le pouvoir pathogène du virus de Theiler pour l'homme.

I. — *Contaminations de laboratoire.*

OBSERVATION I.

La première contamination de laboratoire est rapportée par Theiler en juillet 1930. Elle concerne un sujet qui s'est accidentellement infecté avec un virus de 31^e passage, lors des premières expériences de mutation du virus amaril.

Le sujet T... présente brusquement un accès fébrile avec courbature, l'élévation de température varie entre 38 et 39°5 et dure quatre jours, pendant lesquels on observe, en plus d'une asthénie légère, une hypotension artérielle, un pouls lent par rapport à la température, une forte leucopénie et des traces d'albumine dans les urines. Au cinquième jour, la température baisse et tout rentre dans l'ordre.

Les 2 autres cas sont rapportés par Berry et Kitchen en même temps que 5 autres contaminations accidentelles de laboratoire, mais ces dernières, dues au virus amaril normal,

n'entrent pas dans le cadre de cette analyse; les deux infections dues au virus de souris concernent des anatomo-pathologistes travaillant à New-York, au laboratoire de la fièvre jaune de la Section d'hygiène internationale de la Fondation Rockefeller.

L'un, S. F. K..., s'est infecté avec un virus de souris comptant de nombreux passages (les auteurs ne précisent pas) et issu de deux souches : s. Asibi et s. française. Le moment précis de la contamination n'a pu être déterminé.

L'autre, W. L..., s'est infecté au contact d'un virus comptant plus de 130 passages. Dans ce cas, le moment et la voie d'inoculation ne sont pas davantage connus.

OBSERVATION II.

S. F. K..., âgé de 28 ans, admis à l'hôpital le 4 septembre 1930, trois jours après le début de sa maladie.

A son admission, se plaint de maux de tête, maux de reins et de douleurs orbitaires.

Antécédents. — Sinusite et bronchites à répétition.

Le malade avait reçu, cinq semaines avant le début des signes cliniques actuels, une injection préventive de 5 cm³ de sérum immun, d'origine humaine.

Maladie actuelle : Début brusque à la fin de la journée du 2 septembre par une hyperesthésie généralisée. Dans la soirée, apparition d'une barre lombaire, de la céphalée et de la douleur provoquée par le mouvement des yeux. Le sommeil était coupé par des sueurs profuses et des frissons. Température au matin du 3 septembre, 38°5; pouls à 72. Dans l'après-midi, la céphalée et les courbatures régressent, mais le patient présente un facies vultueux, les conjonctives sont injectées, les globes oculaires sensibles à la pression. A ces signes s'ajoutent l'anorexie et des nausées sans vomissement.

A l'admission, le 4 septembre, température, 39 degrés; pouls, 64. Congestion de la face et des conjonctives. Les mouvements des globes oculaires sont douloureux. Les extrémités sont froides et

moites. Langue chargée, pharynx rouge. Aux poumons, signes de bronchite.

Cœur : Bruits normaux. Pression artérielle : Mx, 14; Mn, 8. Electrocardiogramme normal.

Abdomen souple. Foie normal. Rate non perceptible.

Sang : Leucopénie à 3.800.

Urines normales.

Le 5 septembre, pas de changement.

Le 6 septembre, la dissociation entre le pouls et la température est nette (température, 38 degrés; pouls, 50). A la congestion de la face succède une grande pâleur.

Urines : 11 centigrammes d'albumine. Cylindres granuleux et hyalins et quelques leucocytes.

Le 7 septembre, le malade se sent mieux. Leucopénie à 2.800; la température revient à la normale et y demeure. Le taux de l'albumine dans les urines atteint 13 centigrammes, on en trouve encore des traces trois jours après. L'analyse n'en décèle plus le quatrième.

Les 8 et 9 septembre, l'état s'amende de plus en plus, l'examen des crachats, émis en abondance, ne révèle pas de sang et pas de bacille de Koch; l'examen des selles ne révèle pas d'hémorragies.

Le 14 septembre, le malade commence à se lever; le pouls est à 53. Par ailleurs, rien à signaler.

Sang : 7.000 leucocytes par millimètre cube.

Le 24 septembre, le malade quitte l'hôpital en bon état. L'épreuve à la phénolsulfonephtaléine pratiquée avant son départ donne un taux d'excrétion de 60 p. 100. Ce malade a guéri sans séquelles.

OBSERVATION III.

L... (W.), 27 ans; admis à l'hôpital le 11 mars 1931.

Premier jour de la maladie.

A son admission : Se plaint de frissons, malaise général et céphalée.

Antécédents : Diphtérie à 10 ans.

Le sujet avait reçu, sept semaines avant le début de la maladie actuelle, 5 cm³ d'un sérum humain hyperimmunisé.

Maladie actuelle : Début brusque le 10 mars 1931 par une sensation de soudaine faiblesse et de froid suivie d'un violent et court frisson. La nuit, le malade est insomniaque, et les frissons se renouvellent en même temps que s'installe une céphalée frontale accompagnée d'étourdissements. Le lendemain matin, le malade se rend au laboratoire, qu'il est obligé de quitter après deux heures de travail pour aller s'aliter. Il présente alors des sensations alternées de chaud et de froid en même temps que la courbature se généralise. Il est admis à l'hôpital dans l'après-midi, quatorze heures après le début des symptômes.

A l'admission, 11 mars : Température, 39°8; pouls, 118; respirations, 24. Le patient a l'aspect d'un sujet exposé à un feu violent. La face, la tête, le cou, la nuque et les épaules, la partie supérieure de la poitrine, étaient couverts d'un érythème scarlatini-forme. Le regard était hébété, les yeux congestionnés, chauds et larmoyants. Les lèvres étaient sèches, craquelées, épaissies. Les gencives étaient turgides et rouges, mais ne saignaient point. La langue, rouge vif sur les bords, présentait un épais dépôt gris en sa partie centrale. L'haleine était fétide.

Poumons : Rien à signaler.

Cœur : Frémissements diffus à la palpation de la base. Souffle systolique à la pointe. Pression artérielle : Mx, 12; Mn, 7. Electrocardiogramme normal.

Abdomen : Légèrement ballonné. Sonore et dépressible. Foie normal. Rate non perceptible.

Sang : 2.800 globules blancs par millimètre cube.

Urines : Traces d'albumine et rares cylindres granuleux.

Au cours de la première nuit d'hospitalisation, le malade présente des sueurs profuses et un vomissement bilieux sans trace de sang.

Le 12 mars, nouveau vomissement bilieux. Les selles ne contiennent pas de sang. L'érythème de la face s'estompe légèrement. Le pharynx est rouge vif. Par ailleurs, pas de changement. Température, 38 degrés.

Le 13 mars, température, 38°5; pouls, 70. La courbature, la céphalée et les nausées disparaissent. On note de la constipation. Les urines présentent des traces d'albumine.

Le 14 mars, température, 37°5; pouls, 65. Le malade se sent mieux. Objectivement, son état n'est pas satisfaisant. Le pouls est petit, dépressible. Pression artérielle : Mx, 9; Mn, 7. Une selle normale est émise ce jour-là. Les urines ne présentent plus d'albumine. Il y a 3.000 globules blancs par millimètre cube de sang.

Le 21 mars, température, 37 degrés; pouls, 60. L'état du malade s'est rapidement amélioré. Urines normales. 6.000 globules blancs par millimètre cube de sang.

Le 2 avril, le malade commence à se lever et s'alimente normalement, mais une grande asthénie lui interdit tout travail pendant trois semaines encore, après lesquelles il reprend progressivement ses occupations au laboratoire. Guérison sans séquelles.

Dans aucun des trois cas de contamination que nous venons de citer, on ne peut préciser le mode d'inoculation du virus, mais ce qui permet de rapporter la maladie à sa cause, ce sont les résultats de l'examen du sang au double point de vue de la recherche du virus et de l'établissement de l'immunité.

VIRULENCE DU SANG.

Dans l'observation I, la virulence du sang n'a pas été recherchée.

Dans l'observation II, le sang prélevé quarante-deux heures après le début des signes cliniques fut inoculé à un singe par voie sous-cutanée à raison de 3 cm³ 5. L'animal réagit par de la fièvre aux onzième, douzième et treizième jours. Après quoi il résiste sans incident à une inoculation de virus amaril normal. Il ne fut pas tenté d'inoculation à la souris.

Dans l'observation III, le sang fut prélevé aux premier, quatrième et cinquième jours de la maladie.

Sang du premier jour (sang total) : A été inoculé à 1 macaque qui réagit par de la fièvre et une immunité secondaire. Le sang de ce singe, prélevé au moment de la réaction ther-

mique, a permis de transmettre le virus à un deuxième animal, puis de celui-ci le virus a été transmis une fois encore à un dernier macaque. L'immunité, conférée par ces inoculations sériées E, a été mise à l'épreuve par la résistance des macaques à l'injection du virus amaril normal.

Sang du quatrième jour (cellules du sang lavées au sérum physiologique) : Inoculation sériée E de trois singes. Les deux premiers sont immunisés, le dernier macaque meurt de fièvre jaune atypique. Cette expérience a été relatée en détail au chapitre III.

Sang du cinquième jour (cellules du sang lavées au sérum physiologique) : 3 singes sont inoculés en série, même résultat qu'avec le sang du premier jour, fièvre et immunité consécutive.

Dans les 2 cas, le sang des malades est inoculé à la souris par voie intracérébrale. On obtient constamment la mort de ces animaux par encéphalite, avec le sang du premier patient, alors qu'avec le sang du deuxième les inoculations donnent les résultats suivants : le sang total des premier, deuxième, troisième et quatrième jours de la maladie est inoculé chaque fois à 24 souris. Un lot de 12 souris est inoculé avec le sang du cinquième jour. La mortalité par encéphalite, qui est de 24/24 avec le sang du premier jour, diminue jusqu'au cinquième où, sur les 12 souris inoculées, aucune ne réagit.

IMMUNITÉ DÉVELOPPÉE AU COURS DE CES INFECTIONS.

Dans l'observation I, l'immunité fut contrôlée par le test de protection intrapéritonéal de la souris.

Dans l'observation II, le sérum prélevé au septième jour de la maladie injecté au macaque à raison de 1 cm³ par kilo de son poids le protège parfaitement contre l'inoculation de 0,4 cm³ de sang virulent de singe mort de fièvre jaune.

Dans l'observation III, le sérum prélevé le sixième jour, éprouvé dans les mêmes conditions, protège également le macaque.

Le test de protection de la souris a été pratiqué dans ce dernier cas avec les sérums prélevés du troisième au cinquième jour de la maladie. Il est négatif dans 100 p. 100 des cas avec le sérum du troisième jour. Il est positif dans 100 p. 100 des cas avec le sérum du cinquième jour.

Il est à remarquer que chez ce malade les globules lavés à partir du sang du cinquième jour avaient provoqué une infection immunisante des macaques, alors que le sang total n'avait pas infecté les souris et que le sérum du même moment donnait un test de protection positif. Les auteurs concluent que la présence simultanée de virus et d'immunités peut être révélée aux quatrième et cinquième jours de la maladie accidentelle due au virus murin. Ces faits concordent avec ceux que relate Hudson à propos de la fièvre jaune naturelle et avec les observations de Smith relatives à l'étude du virus amaril chez le cobaye.

II. *Manifestations observées au cours de la vaccination.*

Seule la vaccination de Laigret permet d'isoler parfaitement ces manifestations infectieuses spécifiques, car, comme nous le verrons à propos de la séro-virus-vaccination, l'introduction dans l'organisme de sérum et de virus ne permet pas de faire rigoureusement la part des accidents anaphylactiques, sériques ou proprement infectieux.

OBSERVATION IV.

Laigret et Sellards (nov. 1931), dans une première série de 6 vaccinations à l'Institut Pasteur de Tunis, relèvent 1 cas de réaction bénigne :

Un sujet est inoculé avec 1 cm³ d'une solution à 1 p. 100 de cerveau virulent de 134^e passage. On note aux sixième et septième jours 2 crochets thermiques à 37°6. Le sujet n'accuse aucun trouble subjectif. Il y a de la bradycardie et de la leucopénie. Au huitième jour, température normale, pouls normal. Pas d'albumine dans les urines.

Laigret (juin 1932) vaccine 7 autres sujets, avec la dose uniforme de 1 cm³ d'une émulsion de cerveau virulent à 1/10.000. Un sujet réagit par la seule élévation thermique, comme dans le cas ci-dessus. Trois autres vaccinés réagissent tardivement : l'un au treizième jour, les autres au quinzième jour de l'inoculation.

OBSERVATION V.

Sujet vacciné le 1^{er} juin 1932. Suivi régulièrement chaque jour, ne présente rien d'anormal jusqu'au 16, date à laquelle apparaissent brusquement dans la soirée des vomissements et de la courbature.

Le 17 juin, température, 38°8. Traces d'albumine dans les urines. Le malade tousse et se plaint d'étreinte thoracique.

Le 18 juin, température, 39°6; état nauséux permanent, avec vomissements facilement provoqués. La toux persiste, sans signes pulmonaires. Les conjonctives sont subictériques.

Le 19 juin, les vomissements ont cessé, l'albumine a disparu des urines. Le malade est prostré et anxieux.

Le 20 juin, trémulation de la langue et abolition des réflexes rotuliens.

Le 21 juin, ictère généralisé discret. Prostration persistante et trémulation de la langue. Température à 38 degrés.

Le 22 juin, expectoration hémorragique. Hyperesthésie généralisée.

Le 23 juin, état nerveux comme précédemment. Nouvelle expectoration fortement hémoptoïque.

Le 24 juin, réapparition des réflexes; température, 36°4. Cessation de la toux et de l'expectoration.

Guérison sans séquelles.

OBSERVATION VI.

Patient vacciné le 1^{er} juin, dans les mêmes conditions que le précédent. L'observation clinique ne décèle rien pendant quinze jours.

Le 16 juin, apparition brusque de courbatures généralisées. Température, 37°5; albumine dans les urines (moins de 25 centigrammes).

Le 17 juin, température à 40 degrés. Examen somatique absolument négatif. Pas d'albumine dans les urines.

Le 18 juin, température, 37°9. Ictère généralisé discret. Albumine dans les urines (25 centigrammes) et pigments biliaires.

Le 19 juin, température, 38°9. Albumine urinaire à 25 centigrammes encore.

A partir du 20 juin, retour persistant de la température à la normale. L'albumine disparaît des urines et n'y reparait qu'à l'état de traces les 22 et 23 juin.

Guérison sans séquelles.

OBSERVATION VII.

Sujet vacciné le 1^{er} juin comme précédemment.

Les 6 et 7 juin, forte céphalée; température à 38°4; traces d'albumine dans les urines. Rémission complète des signes jusqu'au 14 juin.

Le 14 juin, température, 39°5. Malade prostré. 25 centigrammes d'albumine dans les urines. Le malade émet plusieurs crachats sanguinolents.

Le 15 juin, même état, abondante expectoration hémoptoïque.

Les 16 et 17 juin, état stationnaire. Température, 39-39°4. Albumine, 25 centigrammes par litre d'urine.

Les 18, 19 et 20 juin, chute lente de la température jusqu'à 38 degrés. Persistance de l'albuminurie. Vives douleurs dans les membres. Raideur de la nuque sans Kernig. Réflexes tendineux vifs. Langue trémulante.

Le 21 juin, la température descend jusqu'à 37°8. L'albuminurie a disparu et ne réapparaît qu'à l'état de traces le 22 juin.

Jusqu'au 24, et bien que la température se maintienne au-dessous de 37 degrés, les signes nerveux persistent. Il y a du subictère des conjonctives. L'expectoration, fortement hémorragique, est abondante.

Le 25 juin, cessation brusque des signes nerveux. Les crachats hémoptoïques persistent jusqu'au 27.

Guérison sans séquelles.

Les trois dernières observations que nous allons rapporter concernent des sujets vaccinés avec un vaccin titré; les deux premières rendent compte d'accidents qui se sont produits en A. O. F.; la troisième nous a été communiquée par le Docteur René Martin, de l'Hôpital Pasteur, à Paris, qui avait bien voulu nous donner les résultats de ses vaccinations.

OBSERVATION VIII.

D..., 32 ans. A reçu le 1^{er} vaccin le 11 juin 1934.

Au dix-septième jour de l'inoculation, le sujet présente de la céphalée, des vomissements, de la constipation. Le sixième jour après le début des malaises, la température est à 38°2, et le malade est hospitalisé.

A l'admission : Céphalée très vive, avec sensation de battements dans la tête. Légère obnubilation. Raideur de la nuque sans Kernig. La face est congestionnée. La température se maintient à 39 degrés pendant dix jours. Dans le même temps, le syndrome méningé persiste sans changement. L'examen du liquide céphalo-rachidien révèle, le 3 juillet, une lymphocytose à 100 éléments et une albuminorachie à 56 cg. p. 1.000. Le pouls est dissocié de la température. Il n'y a pas d'ictère, ni d'albumine dans les urines. Les recherches d'hématozoaires et de spirochètes ont été négatives. Après cette période de huit jours, les signes méningés s'amendent rapidement. La température descend. Le liquide céphalo-rachidien, examiné le 31 juillet, ne révèle rien d'anormal.

Guérison sans séquelles.

OBSERVATION IX.

G..., 40 ans. 1^{er} vaccin le 14 juin 1934 : Pas de réactions.

2^e vaccin le 29 juin. Au sixième jour de la deuxième inoculation, se plaint d'une courbature lombaire qui s'estompe jusqu'au

13 juillet. Au réveil, le malade s'aperçoit qu'il ne peut marcher qu'avec difficulté. Il est hospitalisé, et on note à son admission :

Etat général satisfaisant; température, 38 degrés; démarche hésitante; avec imminence de chute si le malade n'est pas soutenu. Dans la position couchée, le patient ne peut lever les jambes au-dessus du plan du lit. Les réflexes tendineux sont exagérés aux membres inférieurs. Ni clonus de la rotule, ni Babinski. Hypoesthésie des membres inférieurs remontant sur le tronc jusqu'au rebord costal. Pas de trouble des sphincters. Les membres supérieurs et la face sont indemnes. Le malade présente, en plus, un syndrome méningé : céphalée vive et raideur de la nuque. Le liquide céphalo-rachidien contient 40 cellules par millimètre cube et 50 centigrammes d'albumine pour 1.000.

Deux jours après le début des signes, la température monte. Le malade est délirant. La face et les conjonctives sont congestionnées. Il n'y a pas d'aggravation de la paraplégie.

Après quarante-huit heures d'hyperthermie et d'abondantes sueurs, le malade se sent mieux.

Le 20 juillet, disparition de tout signe nerveux.

Guérison sans séquelles.

OBSERVATION X.

W. G..., 58 ans (Hôpital Pasteur).

Antécédents : Nombreux séjours aux colonies. Paludisme et dysenterie amibienne.

Le 1^{er} décembre 1934, le patient reçoit 0,5 cm³ du vaccin n° 706 (valable jusqu'au 15 déc. 1934).

Le 7 décembre, réaction fébrile de deux jours (38°5-39°5) avec céphalée, frissons, bouffées de chaleur et barre lombaire, puis rémission complète des signes jusqu'au 14 décembre.

Le 14 décembre, nouvelle réaction semblable à la précédente d'une durée de quatre jours.

Le 19 décembre, alors que la température redevient normale, la céphalée, la lombalgie, les courbatures, sont accrues, et le tableau se complète par des troubles psychiques avec désorienta-

tion dans le temps et dans l'espace. Après six jours, les signes ont tous disparu.

Guérison sans séquelles.

III. — *Action pathogène du virus rapportée dans le cadre de la virus-vaccination.*

L'observation IV est le type défini par Laigret : « *Réaction légère avec température normale ou à peine subfébrile* ».

Les observations VIII, IX, X, entrent dans le cadre des « *réactions sévères* ».

Entre ces deux types extrêmes de réactions, on observe « *la réaction fébrile du sixième jour* » :

Après une incubation remarquablement fixe de six, ou exceptionnellement sept jours, elle débute par une hyperthermie brusque à 38°5 ou 39 degrés, d'ordinaire sans frissons, et qui atteint d'emblée son maximum. La céphalée est vive. La courbature lombaire simule le « coup de barre ». L'accès fébrile, accompagné ou non de vomissement, dure de dix à trente heures. Les urines présentent souvent des traces d'albumine. Il y a généralement de la bradycardie et de la leucopénie. On n'a jamais observé d'hémorragies ou d'ictère. L'asthénie succède aux courbatures; elle disparaît rapidement, et au quatrième jour, après le début des signes, le patient est complètement rétabli.

En résumé : Toutes les réactions que nous venons d'analyser révèlent les aptitudes pathogènes du virus de Theiler pour l'homme. Elles vérifient les données expérimentales. Le virus murin reste essentiellement neurotrope; mais dans la complexité de ses effets, on reconnaît la marque de qualités ancestrales que, malgré sa mutation, le virus de Theiler conserve comme pour témoigner de son identité.

LA SERO-VIRUS-VACCINATION

I. — *Base expérimentale de la méthode.*

Dès que le virus amaril fut manipulé dans les différents laboratoires, on réalisa maintes fois, sciemment ou non, la séro-vaccination du macaque : lorsqu'on désirait éprouver la valeur immunisante d'un sérum d'ancien jauneux ou de singe ayant survécu à la maladie expérimentale, on injectait à un macaque réceptif une quantité variable de ce sérum ; après quoi, on lui inoculait une dose sûrement mortelle de virus amaril normal.

Les macaques ainsi éprouvés survivaient sans réagir si les sérums provenaient d'un organisme immunisé ; mais de plus, et cela était constant dans les épreuves, les macaques à qui le sérum immun avait conféré une immunité certaine résistaient ultérieurement à une deuxième inoculation, fortement virulente. A l'immunité passive, les animaux ajoutaient donc le bénéfice d'une immunité active régulièrement contrôlable.

Dès 1928, Pettit avait signalé cette forme de l'immunisation du macaque. De telles vaccinations furent si facilement répétées que, en 1931, Beaurepaire-Aragao en réalisa une application méthodique chez le singe. L'action protectrice du sérum à l'égard du pouvoir pathogène du virus amaril était si évidente, et l'effet antigénique de ce virus si parfaitement conservé, que l'auteur fixa une technique de vaccination qu'il proposa pour l'immunisation de l'homme.

Malgré les heureux résultats obtenus chez l'animal, on

refusa d'appliquer à l'homme cette vaccination, qui introduisait dans l'organisme un virus normalement virulent dont on craignait de voir un jour se manifester les qualités pathogènes redoutables.

En 1930, la découverte de Theiler, qui apportait aux biologistes un virus modifié et doué des mêmes propriétés antigéniques que le virus amaril normal, permit à la séro-virus-vaccination de sortir du domaine expérimental.

Kitchen et Lloyd furent les premiers à utiliser le virus de Theiler pour la vaccination humaine. Mais convaincus du pouvoir pathogène du virus chez l'homme, à la suite des deux inoculations accidentelles qu'il leur avait été donné d'observer dans leur laboratoire, ils refusèrent de l'employer seul, et, dans ces conditions, réalisèrent les premières séro-virus-vaccinations.

II. — *Evolution de la technique.*

De 1931 à 1933, la protection initiale que l'on confère aux vaccinés est empruntée à un sérum de sujet guéri de fièvre jaune ou récemment vacciné. On devine que la production d'un tel sérum, forcément limitée, restreint l'application de la méthode.

En 1934, on dispose d'un sérum anti-amaril de cheval dont la préparation a été mise au point de 1928 à 1933 par Pettit, Stéfanopoulo et Frasey. La production illimitée d'un tel sérum élargit aussitôt l'application de la séro-virus-vaccination.

On peut donc reporter l'évolution de la technique à deux périodes :

La première, qui s'étend de 1931 à 1933;

La deuxième, qui s'ouvre au début de 1934.

PREMIÈRE PÉRIODE : *Utilisation d'un sérum immun d'origine humaine.* — En mai 1931, Sawyer, Kitchen et Lloyd publient les observations des 14 premières vaccinations effectuées à New-York. La technique employée est la suivante :

Injection sous-cutanée de sérum de convalescent à raison de 0,3 à 0,4 cm³ par kilo, c'est-à-dire de 33 à 43 cm³ de sérum pour un homme adulte; puis, six à huit heures après, injection sous la peau dans la région deltoïdienne de 0,08 à 0,3 gramme d'extrait sec d'une dilution de 1/10 de cerveau de plus de 100 passages.

Le virus avait été conservé à la glacière à l'état congelé pendant huit mois. Au moment de l'emploi, il était redissous extemporanément dans une petite quantité de sérum immun.

En janvier 1932, Beaurepaire-Aragao (Rio de Janeiro) publie ses cinq premières observations :

Deux vaccinés, M. E. et C. B., ont reçu sous la peau un mélange de 4 cm³ de sérum d'ancien jauneux et de 0,001 gramme de virus frais de souris.

Chez les trois autres patients : A. F., T. B. et A. S., la technique a été modifiée dans le but de « donner à l'organisme une protection préalable par le sérum ». Tous trois ont été inoculés le matin avec 3 cm³ de sérum injecté dans le muscle, et six heures après avec un mélange du même sérum immun et de 0,001 gramme de virus vivant frais de souris par voie sous-cutanée.

En janvier 1934, Findlay publie les résultats des 230 vaccinations qui ont été réalisées jusqu'à cette date à Londres.

a) Les 40 premières personnes ont été inoculées par voie sous-cutanée avec 0,3 à 0,5 cm³ de sérum anti-amaril de convalescent, par kilo de poids, et quatre à six heures plus tard cette injection a été suivie de l'inoculation sous la peau du bras de 0,25 à 0,50 cm³ d'une suspension filtrée sur Seitz à 10 p. 100 de cerveau de souris dans du sérum humain normal.

Ce sérum, avant d'être employé, est soumis à la réaction de B.-W. et à la filtration de ces immunisines. On n'a utilisé aucun sérum dont le taux de protection soit inférieur à 1/256.

Avant l'emploi, ces sérums sont filtrés sur Seitz et additionnés de 0,02 p. 100 de tricrésol dissous dans une quantité égale d'éther. Les échan-

tilions de ces sérums sont éprouvés pour garantir l'absence de germes pendant une semaine à l'étuve à 37 degrés sur des milieux de cultures aérobie et anaérobie. Les sérums sont répartis en ampoules de 10 à 20 cm³ et conservés à la glacière. Dans ces conditions, leurs propriétés immunisantes restent intactes pendant au moins trois mois.

Pour obtenir le vaccin on n'utilise qu'une seule race de souris. De temps en temps, on sacrifie une souris apparemment saine et on inocule son cerveau à d'autres souris pour éliminer les risques d'une infection latente dans l'élevage.

b) Le second groupe de vaccinés comprend 110 personnes. Chaque patient a reçu une inoculation *intradermique* dans la région du ventre, de 1 cm³ de sérum anti-amaril humain, suivie deux heures plus tard de 0,1 à 0,5 cm³ de virus à 10 p. 100 inoculé à la même place.

c) Un troisième groupe comprend 50 vaccinés qui ont été inoculés comme les 110 précédents, mais en plus ces 50 patients avaient reçu, six heures auparavant, 5 cm³ de sérum immun en injection sous-cutanée.

d) Enfin, 30 sujets ont été vaccinés de la façon suivante : injection sous-cutanée de 0,3 à 0,5 cm³ de sérum immun, et six heures plus tard inoculation sous la peau du bras de 0,1 à 0,5 cm³ de virus murin dilué à 10 p. 100 et filtré sur Seitz.

Au moment où Findlay publie ses observations, Kitchen et Lloyd rapportent 40 nouveaux cas de vaccinations réalisées suivant la même technique qui leur avait servi à l'immunisation des 14 premiers patients.

DEUXIÈME PÉRIODE : *Utilisation du sérum anti-amaril de cheval*. S. A. A. — En avril 1933, Stéfanopoulo avait fait titrer par Kitchen et Lloyd le pouvoir immunisant de sérum anti-amaril de cheval dont le Professeur Pettit avait vérifié le pouvoir préventif au cours d'une large expérimentation chez le macaque. D'après les titrages, le sérum anti-amaril équin neutralisait par centimètre cube environ 2.000 doses minima mortelles pour la souris, alors que les meilleurs

sérums humains provenant d'anciens jaunes filtraient généralement moins de 1/500.

Disposant ainsi d'un sérum qu'on pouvait injecter en quantité plus petite et dont la production était illimitée, on voyait se lever les obstacles essentiels à la large pratique de la séro-virus-vaccination.

Ce sérum anti-amaril de Pettit, Stéfanopoulo et Frasey a été employé pour la première fois au début de 1934 à l'Institut Pasteur de Paris pour la vaccination de 10 volontaires qui reçoivent sous la peau de l'abdomen 10 cm³ de sérum (brut ou purifié), et six heures après une inoculation sous-cutanée de virus dilué au 1/10 et filtré sur Seitz, à raison de 0,05 à 0,5 cm³ redissous extemporanément dans de l'eau distillée.

Les candidats à la vaccination sont soumis à un examen minutieux avant le traitement. On refuse « ceux qui sont fébricitants, ceux qui doivent s'embarquer pour la colonie et qui ne peuvent se soumettre à l'observation médicale après la vaccination; on refuse également les albuminuriques, et, en général, tous les sujets ayant une affection chronique du foie ou des reins, enfin ceux dont l'âge est trop avancé ».

En janvier 1935, Findlay publie les observations de 100 patients ayant été vaccinés à Londres avec la technique suivante:

Le virus provient de cerveaux comptant plus de 100 passages, et de préférence moins de 150, parce que « après 200 passages et plus, par le système nerveux de la souris, le neurotropisme a tendance à augmenter et aussi parce que, comme il a été observé pour d'autres virus, par exemple pour le virus de la poliomyélite antérieure aiguë, les passages répétés sur l'animal peuvent causer des modifications antigéniques, de sorte qu'une souche de passage devient incapable de protéger complètement contre une souche fraîchement isolée » (Burnett et Mac Namara, 1934).

Il est injecté de ce virus de 0,001 à 0,2 cm³, d'une solution à 1/10 de cerveau virulent dans du sérum humain normal, desséché dans le vide, conservé à l'état congelé, et dissous un peu avant l'emploi dans de l'eau distillée stérile.

Le sérum anti-amaril de Pettit a été injecté à la dose de 0,2 à 0,4 cm³ par kilo sous la peau de l'abdomen des patients, deux heures avant l'inoculation du virus.

En février 1935, lors de notre passage à Paris, le Docteur Stéfanopoulo a bien voulu nous initier à la pratique de la séro-vaccination, telle qu'elle est effectuée à l'heure actuelle à l'Institut Pasteur, au laboratoire du Professeur Pettit.

Après avoir subi un examen clinique complet, les patients reçoivent dans la matinée : 10 cm³ de sérum anti-amaril (S. A. A.) concentré, donnant un taux de protection minima de 1/3.000 (chez les sujets ayant déjà subi des injections de sérum de cheval, on pratique la méthode de désensibilisation de Besredka).

Dans l'après-midi, les patients subissent sous la peau de la région deltoïdienne l'inoculation du vaccin qui se présente à l'état desséché conservé dans des ampoules vides d'air au frigidaire. Ce virus sec correspond à 0 g. 50 de cerveau frais dilué au 1/10 dans du sérum normal de cheval ou de lapin. Au moment de l'emploi, on ramène extemporanément le volume du matériel virulent à 1 cm³ par addition d'eau distillée : le sujet reçoit donc 0,05 g. de cerveau virulent.

A l'heure actuelle, la technique semble fixée définitivement, c'est celle que Sawyer, Kitchen et Lloyd appliquaient dès 1930, comme il a été dit, et qui a pu être simplifiée grâce au sérum anti-amaril de cheval dont la richesse en immunisines permet de réduire la quantité injectée à 20 ou 10 cm³, suivant les taux de protection.

L'immunité passive ainsi conférée permet d'inoculer à l'homme des doses fortement virulentes, donc sûrement antigéniques, de virus de Theiler.

D'après les titrages de Findlay (et ces titrages valent pour les vaccins de Paris), le virus qui fournit le vaccin contient, dans 0,03 cm³ d'une solution au 1/1.000.000, une dose minimum mortelle pour la souris. On peut donc calculer que les sujets vaccinés ont reçu des quantités de virus dont la richesse varie de 300 à 15.000 U. S.

III. — Réactions observées au cours de la séro-virus-vaccination.

LEUR NATURE. — Elles sont rapportées soit à l'injection du sérum, soit à l'inoculation du virus. En fait, les vaccinateurs eux-mêmes font difficilement le départ entre les réactions anaphylactiques, les réactions proprement infectieuses et la maladie sérique.

La classification que nous allons rapporter de ces réactions ne s'inspire que de l'interprétation qui en a été donnée par ceux-là même qui les décrivent.

Réactions immédiates et précoces. — Elles sont locales ou générales :

Locales : Elles sont toujours le fait du sérum et consistent en une vague sensation de tension avec quelquefois des brûlures et du prurit;

Générales : Elles sont rapportées à l'action du virus; dans ces cas, la réaction apparaît soudainement « au soir du jour qui suit l'inoculation » (Findlay). C'est surtout un accident fébrile avec courbature généralisée, forte lombalgie, photophobie, céphalée, nausées, vomissements. Il y a exceptionnellement de l'albuminurie. Les signes disparaissent après quarante-huit heures.

Dans quelques cas, chez les sujets sensibilisés au sérum de cheval, on observe immédiatement après la séro-protection ou dans les vingt-quatre heures qui suivent un urticaire floride avec prurit intense.

Réactions tardives dues au virus (Findlay). — De telles réactions rappellent « les réactions fébriles du sixième jour » ou même, dans quelques cas, les « réactions sévères » (Laignret), soit du fait de leur incubation qui oscille autour de six jours, soit du fait de leur caractère clinique où l'on retrouve : les céphalées, la photophobie, la somnolence, l'hyperréflexivité, la constipation, les nausées, les phéno-

mènes congestifs du côté des conjonctives oculaires et du pharynx, la bradycardie et quelquefois l'albuminurie.

Réactions tardives dues au sérum (maladie sérique). — Elles sont surtout constituées par de l'urticaire, des œdèmes cutanés, des arthralgies et un malaise général.

LEUR FRÉQUENCE. — Rapportée aux différents modes de vaccination, la fréquence des accidents s'établit comme suit :

Première période (Emploi de sérum humain). — Chez les 14 premiers vaccinés de Sawyer, Kitchen et Lloyd, aucune réaction d'aucun ordre.

Parmi les 5 vaccinés de Beaurepaire-Aragao, 2 ont présenté la réaction tardive due au virus. Chez ces patients, M. E... et C. B..., la température s'est élevée aux septième et huitième jours à 37°8 et 38°8. Ils présentaient, en outre, de la céphalée et des nausées. Chez l'un de ces vaccinés, M. E..., le virus fut retrouvé dans le sang au moment de la réaction.

Chez les 230 personnes vaccinées à Londres par Findlay, les réactions se répartissent ainsi :

30 p. 100 des vaccinés présentent la réaction générale précoce due au virus. Dans un cas, l'état du patient a été inquiétant : il s'agit du Docteur J.-C. B..., qui, au lendemain de la vaccination, présente une fièvre à 39 degrés, des myalgies violentes et étendues, de la photophobie, de la céphalée. Les conjonctives et le pharynx sont injectés, le malade vomit. Les urines contiennent de l'albumine et des globules rouges. Une profonde asthénie succède à cette réaction sévère dont le malade n'est remis qu'après dix jours de convalescence.

Pour les vaccinateurs, les troubles qu'a présentés le Docteur J.-C. B... relèvent d'une infection concomitante, car, disent-ils : « Le virus ne fut pas décelé dans le sang, et un autre laboratorien inoculé avec le même sérum et le même virus ne présente aucune réaction. »

Chez les 40 vaccinés de Sawyer, Kitchen et Lloyd, en 1934, on relève 26 cas de réaction générale précoce due au virus.

Deuxième période (Emploi de sérum de cheval). — Chez les 10 premiers vaccinés de Stéfanopoulo, 4 présentèrent la réaction précoce due au virus; 4 autres présentèrent de l'urticaire sans signes généraux.

Dans la dernière publication de Findlay, où 100 vaccinations sont rapportées, les réactions se répartissent ainsi :

- 12 p. 100 de réactions générales précoces dues au virus;
- 3 p. 100 de réactions tardives : cas n^{os} 259, 265, 278.

Dans le cas n^o 259, les symptômes sont comparés « à une attaque d'influenza ».

Dans le cas n^o 265, les signes apparaissent dix-huit jours après la vaccination au cours du voyage vers l'A. O. F. Ils consistent en : fièvre élevée, céphalée, photophobie, somnolence, bradycardie et courbature. On n'a constaté ni ictère ni albuminurie.

Dans le cas n^o 278, la maladie a éclaté au cours du voyage vers l'A. O. F. au vingtième jour de la vaccination : elle était comparable à celle du cas précédent. En plus, ce vacciné avait présenté des réactions sériques graves qui avaient débuté au lendemain de l'inoculation par un urticaire généralisé et qui, au dixième jour, ont nécessité des injections d'adrénaline.

Des détails plus précis manquent à propos de ces incidents. Les auteurs précisent seulement qu'il s'agit « de symptômes, curables évidemment, mais sévères, surtout dans les deux derniers cas ».

Dans 47 p. 100 des cas, Findlay signale des réactions dues au sérum. Il s'agit chaque fois, sauf dans le cas n^o 278, de réactions minimales, immédiates, d'anaphylaxie sérique.

Enfin, dans 43 p. 100 des cas, il n'y eut aucune réaction.

IV. — *Immunité conférée par la séro-virus-vaccination.*

VALEUR DE L'IMMUNITÉ. — Plus de 60 p. 100 des vaccinés ont été suivis quant à leurs réactions immunologiques. Cha-

que sérum éprouvé a donné jusqu'à présent un test de protection positif de la souris, et chaque fois qu'il a été injecté au singe il a protégé ce dernier contre une inoculation normalement virulente.

Première période. — 7 des premiers vaccinés de Sawyer, Kitchen et Lloyd, qui avaient supporté le traitement sans réagir, donnent un sérum qui protège le macaque, et tous les 14 vaccinés donnent un sérum qui, éprouvé par le test intrapéritonéal de protection de la souris, « permet d'identifier ces sujets à d'anciens jaunes ».

Les 3 vaccinés de Beaurepaire-Aragao ont donné des sérums qui, éprouvés à raison de 1 à 6 cm³, un mois après la vaccination, ont protégé le macaque contre une inoculation de virus normal.

Sur les 230 vaccinés de Findlay, plus de la moitié ont été contrôlés au cinquième, sixième et septième mois de la vaccination; ils donnent tous un sérum fortement protecteur pour la souris éprouvée intracérébralement.

Deuxième période. — Sur les 10 vaccins de Stéfanopoulo, 6 donnent un test de protection intracérébral de la souris positif à la fin du premier mois de la vaccination.

Sur les 100 vaccinés de Findlay, 56 ont été suivis entre la deuxième et la sixième semaine pour déterminer la valeur immunisante de leur sérum. Chaque fois, les tests de protection étaient positifs et la valeur protectrice des sérums allait régulièrement croissante de la quatrième à la cinquième semaine.

Stéfanopoulo, lors de notre séjour au laboratoire du Professeur Pettit, nous apporta les mêmes précisions à propos du sérum des vaccinés de Paris. Les sérums sont éprouvés dans une forte proportion (environ 70 p. 100) et à plusieurs reprises dans le premier ou au cours des deux premiers mois de la vaccination. Chaque fois, l'immunité est vérifiée par le test de protection de la souris, et pour tous les sérums le taux de protection s'élève entre la quatrième et la cinquième semaine.

APPARITION DE L'IMMUNITÉ. — L'immunité apparaît au plus tôt au septième jour de la vaccination. En moyenne, entre le neuvième et le douzième jour (Sawyer). Elle est solidement établie le quatorzième (Findlay).

De plus, et la précision est importante à apporter, l'immunité ainsi vérifiée est bien une immunité active naissante; d'abord, parce que son taux va croissant à partir du jour où elle se révèle et ensuite parce que la protection que l'organisme emprunte au sérum immun n'est pas vérifiable au moyen du test de séro-protection (Sawyer, Kitchen et Lloyd).

DURÉE DE L'IMMUNITÉ. — La résistance des sujets vaccinés a été souvent contrôlée aux sixième et septième mois et à la fin de la première année de la vaccination par Sawyer, Stéfanopoulo et Findlay. Les premiers vaccinés de New-York donnaient un test de protection positif plus de deux ans après la vaccination.

Stéfanopoulo, Findlay et ses collaborateurs fournissaient un sérum protecteur plus d'un an et demi après la vaccination (communication orale).

REVACCINATIONS. — Elles peuvent toujours être pratiquées, et d'une manière simplifiée, en inoculant uniquement le virus. Cette revaccination a été pratiquée par Kitchen et Lloyd dès 1931; elle n'entraîne aucune réaction, et chaque fois la valeur protectrice du sérum est augmentée.

Stéfanopoulo pratique volontiers, chaque fois qu'il en a l'occasion, cette vaccination de renforcement avec le virus seul dans les trois semaines qui suivent la primo-inoculation; il n'a jamais observé le moindre incident, et chaque fois l'immunité était notablement renforcée (communication orale).

V. — *Circulation du virus dans le sang des vaccinés.*

On a cherché souvent à mettre en évidence la virulence du sang des vaccinés soit au cours des réactions qu'ils manifestèrent, soit systématiquement à titre d'enquête. Cette virulence n'a été démontrée qu'une seule fois : chez un vacciné de Beaurepaire-Aragao qui avait présenté au septième jour de la vaccination une légère hyperthermie sans autres signes.

Le sang prélevé à ce moment, inoculé par voie intracérébrale à la souris, l'infectait régulièrement, et cette infection était transmissible en série.

CHAPITRE VI

LE VIRUS-VACCINATION

I. — *Evolution de la technique.*

Cette évolution sera, pour la commodité de l'exposé, artificiellement divisée en trois périodes :

PREMIÈRE PÉRIODE : 1931-1933.

Utilisation de vaccins de virulence indéterminée. — Le premier sujet vacciné est une femme démente dont l'état justifie la pyrétothérapie :

Elle est vaccinée en trois fois : La première inoculation est faite le 11 novembre 1931; elle comporte l'injection de 0,5 cm³ d'une solution au 1/1.000.000 de cerveau virulent de 139^e passage.

Le 21 novembre, elle reçoit 1 cm³ d'une solution virulente à 1/10.000.

Le 29 novembre, elle reçoit 1 cm³ de la solution au 1/10.

Quatre autres patients présentant également des infections nerveuses chroniques sont soumis à la vaccination avec le même matériel, mais avec des dilutions et suivant des techniques variables.

L'un d'eux reçoit, à 14 jours d'intervalle, deux injections sous-cutanées, la première de 1 cm³ de virus dilué à 1/10.000, la seconde de 1 cm³ de virus dilué au 1/10.

L'autre est vacciné en deux temps aussi et avec les mêmes solutions, mais il reçoit 3 cm³ du vaccin au 1/10 au lieu de 1 cm³ comme précédemment.

Les deux derniers patients subissent une seule inoculation : l'un de 1 cm³ d'une solution à 1/10.000, l'autre de 1 cm³ de la solution à 1 p. 100.

En juin 1932, le virus employé pour ces premières vaccinations en est à son 143^e passage. Un cerveau de ce passage est utilisé pour l'immunisation de 7 sujets qui reçoivent uniformément, le 1^{er} juin 1932, 1 cm³ d'une solution virulente à 1/10.000.

Alors que les vaccinés de la première heure avaient supporté sans réagir des inoculations d'un virus dilué au 1/10.000 et même au 1/100, trois des vaccinés de la deuxième série réagissent par une maladie sévère à l'injection d'une solution virulente au 1/10.000 : Laigret présume à la suite de ces incidents que les cerveaux, au moment du prélèvement sur la souris paralysée, sont de virulence inégale. Il confirme ses présomptions par une enquête rétrospective sur les passages :

Le 139^e passage a été effectué sur un lot de 6 souris dont 1 meurt le septième jour, 2 meurent le huitième, 1 meurt le onzième, et 2 survivent. Un cerveau de ce passage a fourni les solutions au 1/10.000 et au 1/10 qui, inoculés à un même sujet, n'ont produit aucune réaction.

Le 140^e passage laisse survivre 2 souris sur 11. 2 meurent tardivement les onzième et quinzième jours, 7 meurent entre le septième et le huitième jour. Pas de réaction chez les vaccinés avec les cerveaux de ce passage.

Le 141^e passage n'a pas fourni de vaccin.

Le 142^e passage se fait sur 10 souris. Pas de survie. 9 souris sont mortes le huitième jour, la dernière meurt le neuvième.

Le 143^e passage se fait sur 5 souris, qui sont toutes mortes au septième jour. Ce passage fournit un cerveau dont la dilution au 1/10.000 a été inoculée simultanément aux 7 patients vaccinés au mois de juin.

1/16 de cm³ de la solution au 1/1.000.000 de ce virus de 143^e passage tue la souris d'encéphalite, alors que seule la

solution au 1/10.000 des cerveaux de 139° et 140° passages contenait dans 1/16 de cm³ la dose minimum mortelle pour la souris.

La constatation de la variabilité de virulence des cerveaux des souris conduit Laigret à rechercher un mode de vaccination dans lequel on inocule des quantités connues de virus.

Ces préoccupations nous conduisent à la deuxième période.

DEUXIÈME PÉRIODE : 1933-1933.

Atténuation et titrage des solutions virulentes. Vaccins glycélinés et vaccins secs. — Laigret signale en manière d'introduction à sa nouvelle technique que le comportement du virus amaril (de singe ou de souris) soumis à l'action des divers agents physiques ou chimiques a été bien étudié, mais qu'il semble qu'on n'en ait pas tiré au point de vue pratique les bénéfices qu'on pouvait en attendre. L'auteur rappelle les notions suivantes :

1° Un organe virulent (cerveau de souris ou foie de macaque) garde sa virulence intacte pendant plusieurs semaines s'il est conservé à la glacière à l'état congelé.

2° Une suspension épaisse d'un broyat de cerveau dans la glycérine pure ou diluée à 30 p. 100 se conserve dans les mêmes conditions.

3° Les émulsions de cerveau en eau physiologique (additionnée de 1/10 de sérum de lapin) peuvent être desséchées en présence de phosphates anhydres de potasse et de soude dans un dessiccateur à vide. Les poudres ainsi obtenues conservent leur virulence intacte pendant plus d'un mois à la glacière et pendant plus d'une semaine à la température ambiante dans un climat tempéré.

4° L'exposition de cerveaux virulents en suspension glycélinée à la température de 20 degrés détermine une perte graduelle de leur virulence. Cette diminution est considérable dans les vingt-quatre premières heures; après ce temps, un certain équilibre s'établit pour les taux de virulence faible. Par exemple, un virus qui, éprouvé frais, tue la souris à la solution de 1/100.000 ne donne plus après vingt-quatre heures des inoculations positives qu'avec la dilution au 1/1.000; aux troisième, quatrième et cinquième jours, un tel virus tue encore la souris au 1/100. Après cinq jours, toute virulence a généralement disparu.

De l'ensemble de ces propriétés, l'auteur conclut que l'on peut obtenir des solutions virulentes d'activité connue grâce à l'atténuation et au titrage, et que, grâce à la protection par-

faite de la virulence à la température de la glacière, on peut conserver le virus au degré d'atténuation choisi. Et comme dans les premières expériences l'immunité s'était établie sans réaction avec des vaccins qui (titrés rétrospectivement) contenaient 16 doses minima mortelles pour la souris, Laigret pose, en principe, que des inoculations espacées de virus titrant de moins de 16 U. S. à 160 U. S. suffiront dans tous les cas à faire apparaître l'immunité sans faire courir au patient le risque d'une infection apparente, les réactions sévères n'étant apparues en effet qu'avec des vaccins titrant 1.600 U. S.

Sur ces données s'édifie la technique de préparation des vaccins glycélinés et des vaccins secs.

1° Vaccins glycélinés.

« *Préparations.* — Chaque cerveau est broyé séparément dans un mortier. Une anse de matière cérébrale est ensemencée par un contrôle bactériologique qui doit rester stérile. Le broyage est repris dans 5 cm³ de glycérine pure et introduit dans un tube, fermé par un bouchon de caoutchouc.

« *Atténuation.* — Les broyages glycélinés, par séries de 4, sont exposés à la température ordinaire, dans un endroit obscur, pendant un, deux, trois et quatre jours respectivement. Un cinquième tube est mis directement au frigorifique sans atténuation préalable.

« *Titrage.* — On prélève de chaque broyage 0 cm³ 5 à l'aide d'une pipette graduée. Cette quantité, diluée dans 4 cm³ 5 d'eau physiologique, fournit la dilution 1/100 du virus. A partir de celle-ci, on prépare une dilution de 1/1.000 et une dilution de 1/10.000. Les trois dilutions sont inoculées à des souris, par voie cérébrale, à raison de 1/16 de cm³ pour chaque animal.

« Les souris sont observées pendant quinze jours, temps pendant lequel les suspensions glycélinées sont conservées au frigorifique à environ 15 degrés.

« Les souris ne doivent présenter aucune mortalité pendant les cinq premiers jours. Les morts observées entre le sixième et le quinzième jour donneront le degré de la virulence du vaccin, virulence que nous formulons de la manière suivante.

« a) Mort de toutes les souris jusqu'à la dilution 1/10.000 comprise, virulence + + +. De telles préparations sont trop actives pour servir à la vaccination humaine. Les rejeter.

« b) Mort des souris ayant reçu les dilutions 1/100 et 1/1.000, survie des souris éprouvées avec la dilution 1/10.000 : virulence + +. La préparation sera utilisée pour le vaccin le plus actif, soit le 3^e vaccin.

« c) Mort des souris ayant reçu la dilution 1/100; toutes les autres survivent : virulence +. Préparation bonne pour le second vaccin.

« Survie de toutes les souris : virulence 0. La préparation ayant atteint le degré maximum d'atténuation sera utilisé pour la première vaccination.

» Les titrages irréguliers, ininterprétables, sont généralement dus à des fautes de technique. Rejeter les préparations correspondantes sans les utiliser. ↓

» *Utilisation.* — Les suspensions glycerinées peuvent être employées pour les vaccinations pendant vingt jours après le titrage, à condition qu'elles soient maintenues au frigorifique. On pratique dans le tissu adipeux de la paroi abdominale trois inoculations successives à vingt et un jours d'intervalle, avec les trois vaccins de virulences graduées. Chaque inoculation comprend 1 cm³ du broyage glyceriné dilué au 1/10 dans l'eau physiologique, soit 1 cm³ de la suspension au 1/10 du virus. »

2° Vaccins secs.

« *Préparation : Récolte des cerveaux.* — On sacrifie les souris paralysées entre le cinquième et le huitième jour de l'inoculation. Prélever aseptiquement les cerveaux. Avec une anse de platine; étendre sur un tube de gélose une petite quantité du mélange de matière cérébrale et du sang qui reste dans la cavité crânienne (contrôle bactériologique du prélèvement).

» *Vieillessement des cerveaux.* — Les cerveaux récoltés sont placés dans des petits tubes stériles et recouverts de glycérine pure. Mettre les tubes à l'obscurité dans un placard ou une étuve à 20 degrés. L'un des cerveaux sera ainsi abandonné pendant vingt-quatre heures, l'autre pendant deux jours, le troisième pendant quatre jours. Lorsque le temps nécessaire au vieillissement est écoulé, procéder au broyage.

» *Broyage et dessiccation.* — On dispose d'un mortier stérile et de quatre petits tubes contenant chacun 1 g. 25 du mélange :

Phosphate disodique sec.....	52 g.
Phosphate monopotassique sec	10 g.

» Répartir en petits tubes secs par fraction de 1 g. 25; stériliser au four à 180 degrés pendant trente minutes.

» Verser d'abord le contenu d'un tube dans le fond du mortier. Prélever le cerveau vieilli en glycérine, l'essorer, et le broyer en ajoutant successivement les trois tubes de phosphate restant : La poudre obtenue est contrôlée par ensemencement sur gélose (contrôle bactériologique du broyage), puis mise dans 1 tube au dessiccateur à CaCl₂; faire le vide. Après vingt-quatre heures, la poudre est parfaitement sèche. En prélever 5 cm³, refermer hermétiquement le tube, et le conserver au frigorifique à — 15 degrés.

» *Titrage.* — Avec les 5 centigrammes qui viennent d'être prélevés; faire une suspension dans 5 cm³ d'eau distillée stérile. On a une dilution à 1/100 du vaccin; à partir de celle-ci, dans deux autres tubes, faire une suspension au 1/1.000, puis une suspension à 1/10.000 en ajoutant de l'eau physiologique. Avec chacune des suspensions, inoculer au moins 2 souris par voie cérébrale (1/32 de cm³). Observer les souris pendant quinze jours.

» Si les atténuations ont été convenables, les cerveaux vieillis pendant un jour doivent tuer la souris jusqu'à la dilution à 1/1.000 et non à la dilution à 1/10.000. Les cerveaux de deux jours doivent tuer à la dilution à 1/1.000 seulement. Les cerveaux de quatre jours ne tuent à aucune des dilutions éprouvées. »

Et Laigret schématise ainsi les résultats :

Temps de vieillissement à 29°	Titrage sur souris des suspensions			Vaccin à utiliser comme :
	1/100	1/1.000	1/10.000	
1 jour	+	+	0	1 ^{er} vaccin
2 jours	+	0	0	2 ^e vaccin
4 jours	0	0	0	3 ^e vaccin

+ = Infection positive des souris (paralytie et mort entre le cinquième et le quinzième jour)

0 = Survie des souris.

Teneur en virus des suspensions au 1/100 des trois vaccins
(0 g. 05 de vaccin pour 5 cm³ d'eau).

Temps de vieillissement à 29°	Par 1/32 de cm ³ (dose inoculée à la souris pour le titrage)	Par 1/2 cm ³ (dose inoculée à l'homme pour la vaccination)
1 jour	10 unités-souris	160 U. S. (3 ^e vaccin)
2 jours	1 unité-souris	16 U. S. (2 ^e vaccin)
4 jours	moins de 1 U. S.	— de 16 U. S. (1 ^{er} vaccin)

Répartition en ampoule. Contrôle du vide. — On prend des ampoules à fond rond faciles à travailler au chalumeau, et d'une contenance de 5 à 10 cm³, répartir la poudre dans ces ampoules en se servant d'une cuillère mesure de 0,05; une mesure représente 10 doses. Avant l'opération, les ampoules sont desséchées pendant vingt-quatre heures au moins. Immédiatement après, elles sont vidées d'air et fermées au chalumeau. La bonne conservation du vaccin n'est assurée que si le vide est au moins de 1 millimètre de mercure. L'illumination par la décharge d'un courant de haute fréquence est le moyen de contrôle le plus recommandable. Pour la pratique, Laigret se sert de l'appareil de Tesla, avec le dispositif Hombourger-Durand (*Arch. de l'I. P. de Tunis*, 1934, t. 23, n° 3, p. 384).

Conservation et transport des vaccins. — Dans un vide de 1 millimètre de mercure, à l'obscurité et à basse température, au-dessous de 0 degré, le vaccin reste actif quarante jours au moins. Dans la pratique, on considère les vaccins comme périmés après ce délai. A la température ordinaire, les vaccins se conservent pendant six jours environ.

Inoculation du vaccin. — Ouvrir l'ampoule et reconstituer la dilution initiale, c'est-à-dire que l'on ajoute 5 cm³ d'eau pour une ampoule de 10 doses, et 10 cm³ pour une ampoule de 20 doses. La suspension que l'on obtient est homogène, et celle-ci est inoculée immédiatement à raison de 0 cm³ 5 sous la peau de la paroi abdominale. Les suspensions perdent rapidement leur activité au contact de l'air. Rejeter toute ampoule ouverte qui n'a pas été utilisée dans les vingt minutes. « La 2^e vaccination a lieu vingt jours après la 1^{re}, la 3^e vingt jours après la 2^e. Cet intervalle ne doit pas être écourté. Pour éviter toute erreur, les trois vaccins sont délivrés dans des ampoules de couleurs différentes. »

TROISIÈME PÉRIODE.

Elle débute en juillet 1933 au moment où Laigret introduit dans la pratique de l'immunisation contre la fièvre jaune l'usage d'un vaccin « *enrobé* » inoculable en une seule fois. Le principe de la méthode s'inspire de la technique de préparation de certains vaccins bactériens dans laquelle on prévient la diffusion rapide de l'antigène par l'enrobage dans une suspension huileuse. La pratique de la vaccination anti-amarile au moyen de suspensions virulentes glycérinées ou aqueuses avait abondamment prouvé que l'introduction massive d'un produit fortement virulent était souvent suivie de réactions dues à l'action pathogène du virus. On ne pouvait injecter d'emblée à l'homme une dose de virus sûrement immunisante sans préparer le terrain par des inoculations préalables moins virulentes.

La technique de la vaccination en trois temps ne pouvait donc pas en toute quiétude être simplifiée. Par la méthode récemment préconisée, au contraire, l'inoculation unique introduit dans l'organisme des quantités virulentes variant de 320 à 4.000 unités-souris. Il s'agit naturellement du même virus atténué et titré, mais on ajoute en plus au véhicule (phosphates anhydre de soude et de potasse) un corps gras qui puisse ralentir la diffusion du virus. Trois enrobages ont été éprouvés :

- a) L'huile d'olive neutralisée lavée à l'alcool;
- b) Le jaune d'œuf;
- c) L'enrobage mixte (huile d'olive et jaune d'œuf).

L'enrobage le plus convenable semble, aux dires de Laigret, être constitué par le jaune d'œuf. Le vaccin qui se présente à l'état sec est repris au moment de l'emploi par l'eau distillée, de manière à en constituer une suspension en jaune d'œuf à 1/10. La concentration virulente de ces premiers vaccins a été exagérée à seule fin d'éprouver l'effet de l'enrobage. Nous verrons plus loin les résultats de cette vaccination.

II. — Réactions observées au cours de la vaccination.

LEUR NATURE. — Nous avons dit au chapitre IV comment les réactions observées au cours de la vaccination anti-amarile pouvaient être classées suivant l'intensité des signes en trois cadres :

- Réactions légères sans fièvre;
- Réactions fébriles du sixième jour;
- Réactions sévères.

Quelle que soit leur forme, on les rapporte volontiers à l'action pathogène propre du virus de Theiler, mais il est bon néanmoins d'établir dans quelles conditions cette étiologie peut être vérifiée.

Réaction légère sans fièvre. — Cette réaction comporte une incubation relativement constante de six à huit jours. Le minimum des signes objectifs que l'on constate, à savoir : la leucopénie, la bradycardie et quelquefois l'albuminurie, figurent toujours au tableau de l'infection amarile naturelle ou accidentelle, que celle-ci soit due au virus normal ou au virus murin.

Mais, d'autre part, l'immunité ne suit pas forcément une telle réaction.

Réaction fébrile du sixième jour. — Ici, l'incubation est fixe : c'est celle de la maladie expérimentale de la souris. Quant aux manifestations mêmes de cette réaction, elles se rapprochent par plus d'un point de celles qui suivent une inoculation accidentelle du virus de Theiler. Enfin, et surtout, l'apparition constante de l'immunité après un tel incident permet de conclure à l'infection qui la détermine.

Réactions sévères. — Celles qui sont rapportées dans les observations V, VI, VII, de notre thèse ont été minutieusement analysées par Laigret. Les recherches ont porté sur l'émulsion de matière cérébrale inoculée, sur le sang des

malades, sur le liquide céphalo-rachidien et sur les expectorations hémorragiques, afin de mettre en évidence une infection surajoutée à quoi on puisse rattacher l'incident post-vaccinal.

Matériel inoculé. — Un échantillon de l'émulsion virulente a été ensemencé sur gélose et sur bouillon d'Y. Hall pour cultures anaérobies. Les cultures sont restées stériles. Une autre partie du broyage inoculée au cobaye n'a déterminé aucun trouble chez cet animal. Son sang, examiné quotidiennement à l'ultra-microscope, n'a rien montré d'anormal. Son sérum avait acquis le pouvoir protecteur au douzième jour de l'inoculation.

Le sang. — Prélevé aux différents jours de la fièvre, inoculé au cobaye, n'a déterminé chez cet animal ni fièvre ni jaunisse; l'examen ultra-microscopique de son sang est demeuré négatif. L'hémoculture, à partir du sang des malades, n'a jamais révélé l'existence de germes cultivables.

Le liquide céphalo-rachidien. — N'a pas fourni d'indications précieuses, altéré qu'il était dans sa cytologie et son chimisme, du fait de la syphilis nerveuse que présentaient ses patients.

Expectoration hémorragique. — Dans les deux cas où elle s'est produite, elle révélait une « extraordinaire abondance de spirochètes ». Laigret a tenté l'inoculation de ce spirochète au rat, au cobaye, à la souris. Ces animaux n'ont rien présenté. Leur sang, examiné pendant vingt et un jours et quotidiennement à l'ultra-microscope, n'a pas permis de retrouver des germes visibles. A partir du sang et des viscères broyés de ces animaux, des réinoculation à une deuxième série de rats, cobayes et souris, furent tentées sans effet.

C'est ainsi que Laigret élimine l'éventualité d'une spirochétose ictéro-hémorragique, ou d'une bronchite sanglante, entre autres infections, et conclut : « Il faudrait supposer qu'il existait chez la souris un virus inconnu réunissant les caractères suivants : non-cultivabilité sur les milieux ordinaires; conservation pendant plusieurs semaines sur un cerveau congelé; pouvoir de provoquer chez l'homme l'apparition d'un syndrome fébrile avec signes nerveux marqués, albuminurie et ictère; autant dire que ce virus était le virus amaril lui-même. »

Les réactions sévères des observations VIII et IX ont été l'objet des mêmes investigations à Dakar, où les malades étaient hospitalisés. L'action pathogène propre du virus était seule en cause là aussi.

Les mêmes conclusions valent pour le malade de Paris (obs. X) dont les réactions furent identiques à celles de malades de Dakar. Enfin, l'apparition constante d'un fort pouvoir immunisant du sérum des patients après de telles maladies apporte ici aussi le témoignage concluant de la spécificité de l'agent qui les cause.

LEUR FRÉQUENCE. — Suivant la technique employée, elle s'établit ainsi :

— *Première période* (vaccin de virulence indéterminée). — 42 sujets vaccinés : 1 réaction fébrile du sixième jour, 3 réactions sévères (obs. V, VI, VII).

— *Deuxième période* (vaccin titré) :

a) Avant de pratiquer systématiquement la vaccination en trois temps, Laigret expérimente sur 38 patients avec des techniques différentes, afin de mettre définitivement au point la méthode qu'il préconise :

Inoculation unique du 1^{er} vaccin (— 16 U.S.) : 8 cas :
Pas de réaction.

Inoculation unique du 2^e vaccin (16 U.S.) : 5 cas : Pas de réaction.

Inoculation unique du 3^e vaccin (160 U.S.) : 13 cas :

Réaction légère 1 fois;

Réaction fébrile 4 fois;

Réaction sévère 2 fois.

Inoculation du 1^{er} et du 2^e vaccins avec intervalle de vingt jours :

8 cas : Pas de réaction.

Inoculation du 1^{er} et du 2^e vaccins avec intervalle de vingt jours :

4 cas : Pas de réaction.

b) Avec la mission africaine (juin 1934) commence l'application largement étendue de la vaccination en trois temps. Sur plus de 3.000 cas réunis en février 1935, la fréquence des diverses réactions s'établit ainsi :

Réaction légère sans fièvre : Fréquence indéterminée, car l'absence habituelle de signes subjectifs dans cette forme de réaction empêche une estimation même approximative.

Réaction fébrile du sixième jour : 30 p. 100 de l'ensemble des vaccinations.

Réaction sévère : 3 cas sont connus à l'heure où nous écrivons.

— *Troisième période* (vaccin enrobé). — En juillet 1935 : 94 sujets ont subi la vaccination; aucune réaction n'est signalée.

Rapports entre les réactions observées et la virulence des vaccins.

Nous avons vu, au début de ce chapitre, comment les premières vaccinations furent effectuées par Laigret et comment les réactions observées au cours de ces essais ont conduit l'auteur à rechercher la différence de virulence des produits inoculés, et à la vérifier à la fois par une enquête rétrospective sur les passages et par un titrage (rétrospectif lui aussi) des solutions virulentes qu'il avait employées.

A la suite de tels titrages, un calcul simple permettait d'évaluer en doses minima mortelles pour la souris (= Unité-souris = U.S.) la richesse virulente des vaccins employés dans la première période.

Pour les vaccins utilisés à la deuxième période, la virulence de chaque produit, nous l'avons vu, est connue d'avance.

De l'ensemble des vaccinations de Laigret, il résulte que la richesse virulente d'un vaccin ne rend pas compte à coup sûr des réactions observées.

Des produits qui titrent moins de 16 U.S. ont pu déterminer des accidents aussi sévères que des vaccins qui ont titré 1.600 U.S. D'autre part, des inoculations massives titrant plusieurs milliers d'U. S. ont pu être parfaitement supportées.

Cette indépendance apparente entre la teneur virulente des vaccins et les réactions qu'ils déterminent pourrait être trompeuse si elle n'était pas éclairée par la *valeur relative des faits*.

Nous voyons, en effet, que :

— sur 7 vaccinés qui subissent d'emblée une inoculation équivalent à 1.600 U.S., 3 présentent des réactions sévères;

— sur 12 vaccinés à qui l'on injecte un virus titrant 160 U.S., 2 présentent des réactions sévères;

— sur plus de 3.000 vaccinés avec des virus de concentration croissante, 3 présentent des réactions sévères à l'inoculation de vaccins qui titraient moins de 16 U.S. dans 2 cas et 16 U.S. dans 1 cas.

Voilà pour les réactions sévères.

En ce qui concerne les réactions fébriles du sixième jour qui ont été observées surtout dans la pratique largement étendue de la vaccination, on peut affirmer que leur *apparition* ne dépend nullement de la virulence du vaccin. On sait de cette réaction (Laigret) qu'elle suit tantôt la 1^{re} injection de vaccin, tantôt la 2^e, exceptionnellement la 3^e; mais que son *intensité* est généralement plus grande si elle survient à la 3^e inoculation qu'à la 1^{re}. On sait enfin qu'elle ne se reproduit pas et qu'elle a été jusqu'à ce jour régulièrement suivie de l'installation de l'immunité. Mais surtout cette « réaction fébrile du sixième jour » a permis de faire valoir la variation de la susceptibilité individuelle au virus de Theiler.

Laigret, au cours de la Mission en A. O. F., avait noté que les femmes présentaient exceptionnellement cette réaction, et que celle-ci était quasi constante chez les sujets fatigués par le séjour colonial ou déprimés par une maladie chronique quelconque, mais plus particulièrement par une affection du foie ou des reins. La réaction était rare chez les sujets en parfaite santé.

Les conditions climatiques elles-mêmes, par leur influence sur le comportement individuel, faisaient varier la fréquence des réactions. C'est ainsi qu'à Dakar, où la vaccination a été pratiquée avant le début des chaleurs (juin 1934), 10 patients sur 100 réagissent à la 1^{re} inoculation, alors qu'à Kaolek, sur les bords du Saloum, où l'hivernage battait son plein, les 512 premières inoculations furent suivies de réactions fébriles dans près de la moitié des cas.

III. — *Immunité acquise après la vaccination.*

APPARITION DE L'IMMUNITÉ.

Nous avons vu dans quelles conditions le test de séro-protection de la souris devait être recherché et comment il importait de juger de la valeur protectrice *quantitative* d'un sérum par rapport à l'inoculation à l'animal d'un produit de virulence déterminée (voir test de séro-protection). Grâce à ces estimations, les sérums éprouvés peuvent être rangés en deux catégories : ceux qui donnent un test de protection au taux de $1/64$, ce sont les sérums faiblement protecteurs, et ceux qui donnent un test de protection positif dans un rapport égal ou supérieur à $1/640$, ce sont les sérums fortement protecteurs. De tels sérums garantissent une immunité certaine. Chaque fois qu'ils ont été injectés au singe, même en petite quantité, de 1 à 6 cm³, ils ont protégé ce dernier contre une inoculation fortement virulente de virus amaril normal. Dans la suite, le test de séro-protection intracérébral, à cause des garanties qu'il avait toujours données de l'immunité anti-amarile, à cause aussi de sa pratique simple moins coûteuse, s'est substitué dans tous les laboratoires à l'épreuve de protection du macaque.

Lorsque, dans la suite de notre exposé, rendant compte de la vaccination, nous concluons à l'acquisition de l'immunité, il sera sous-entendu que cette immunité, évaluée par le test intracérébral de la souris, donnait un taux de protection au moins égal à $1/640$. Nous préciserons à l'occasion les taux d'immunité précaire ou les vérifications du test par épreuve du sérum sur le macaque. Ayant ainsi fixé les conventions qui président à l'analyse des résultats de la vaccination, on peut dire que : sur l'ensemble des sujets, l'immunité s'est établie du treizième au quinzième jour de l'inoculation effective.

Si, après vingt jours, l'immunité n'est pas contrôlée, la vaccination a été inopérante. L'apparition d'une fièvre jaune

avant le vingtième jour qui suit la dernière inoculation dans la technique à trois temps ne peut être attribuée à un échec de la vaccination (Laigret).

RELATIONS ENTRE L'APPARITION DE L'IMMUNITÉ ET LA CONCENTRATION VIRULENTE DES VACCINS.

Nous rapporterons cette étude dans le cadre où nous avons décrit l'évolution de la technique de la vaccination :

PREMIÈRE PÉRIODE : *Vaccin de virulence indéterminée titré rétrospectivement.* — Tous les patients de cette époque avaient fourni un sérum qui, avant la vaccination, était dénué de pouvoir protecteur.

Une première série de vaccinés comprend 3 sujets (nov.-déc. 1931).

Chez ces patients, l'apparition de l'immunité s'établit ainsi par rapport à la virulence des vaccins qui leur ont été inoculés :

— 1^{er} vacciné : Apparition de l'immunité après l'inoculation d'un vaccin titrant moins de 0,8 U.S.

— 2^e, 3^e et 4^e vaccinés : Apparition de l'immunité après l'inoculation d'un vaccin titrant 16 U.S. Dans ces 4 cas, l'immunité a été acquise silencieusement, et les patients ont supporté sans dommage l'inoculation ultérieure de vaccins fortement virulents (16.000 à 48.000 U.S.).

— 5^e vacciné : L'immunité est apparue après l'inoculation unique d'un vaccin titrant 1.600 U.S., mais au prix d'une réaction fébrile.

Dans la série suivante (juin 1932), 7 patients ont reçu une unique injection d'un vaccin titrant 1.600 U.S. L'immunité a été acquise dans tous les cas. 3 vaccinés ont présenté une réaction sévère (obs. V, VI, VII).

DEUXIÈME PÉRIODE : *Vaccins titrés.*

a) *Essais préliminaires* (Epreuve des sérums plus de vingt jours après la vaccination) :

1° Inoculation du 1^{er} vaccin (moins de 16 U.S.) : 8 sujets traités, aucune réaction.

Pouvoir protecteur faible dans 3 cas;

Pouvoir protecteur nul dans 5 cas.

2° Inoculation du 2° vaccin (16 U.S.) : 5 sujets traités, aucune réaction.

Pouvoir protecteur fort dans 2 cas;

Pouvoir protecteur faible dans 2 cas;

Pouvoir protecteur nul dans 1 cas.

3° Inoculation unique du 3° vaccin (160 U.S.) : 13 sujets traités :

Réaction sans fièvre 1 fois;

Réaction fébrile du sixième jour 4 fois;

Réaction sévère 2 fois.

Le pouvoir protecteur a été acquis dans tous les cas *avec ou sans réaction*, et pour tous à un degré fort.

4° Inoculation des deux premiers vaccins (moins de 16 U.S. et 16 U.S.) à vingt jours d'intervalle : 8 cas traités, aucune réaction.

Pouvoir protecteur fort dans 7 cas;

Pouvoir protecteur nul dans 1 cas.

5° Inoculation des 3 vaccins à intervalle de vingt jours (soit successivement moins de 16 U.S.; 16 U.S.; 160 U.S.) : 4 cas traités, aucune réaction.

Pouvoir protecteur fort pour les 4 vaccinés.

b) *Application en grand de la vaccination en trois temps* (vaccin sec). — Il est plus difficile d'établir, à propos des vaccinations africaines, la preuve formelle de l'action immunisante du vaccin. Il va sans dire que chaque patient n'a pas été suivi quant à ses réactions sérologiques. Seule à cet

égard l'expérience de Dakar, qui a été complète, semble suffisante pour permettre de conclure à l'efficacité de la vaccination, car elle porte sur plusieurs centaines de sujets (Laigret).

Et de ces contrôles multipliés, il résulte :

- que le pouvoir protecteur des sérums apparaît dans les deux tiers des cas après la première inoculation (— 16 U.S.);
- qu'il est constatable 8 fois sur 10 chez les patients qui ont subi deux inoculations (— 16, puis 16 U.S.);
- qu'il est constamment apparu chez les sujets qui ont subi la vaccination complète (— 16; 16; 160 U.S.);
- qu'il apparaît régulièrement à la suite d'une réaction fébrile (Méd. général Boyé).

Ce dernier point, que nous avons déjà précisé, permet d'affirmer pour une part l'efficacité de la vaccination chez des sujets qui ne sont pas contrôlés au point de vue sérologique. Et c'est ainsi que, ne tablant que sur cette réaction, on conclut à l'immunisation effective de tous ceux qui l'ont présentée, ce qui, dans la statistique de Laigret, garantit au moins 30 p. 100 de vaccinations efficaces.

Par ailleurs, les résultats de la vaccination à Dakar, la valeur expérimentale des vaccinations tunisiennes, permettent d'induire raisonnablement que tous les vaccins ont bénéficié de l'immunité. D'après Laigret, on peut tenir pour certain que l'inoculation d'un virus titrant 160 U.S. a jusqu'à ce jour toujours été suivie de l'apparition des immunisines révélées par le test de protection de la souris, et dans bon nombre de cas par la protection du macaque contre l'inoculation du virus amaril naturel.

TROISIÈME PÉRIODE : *Vaccin enrobé*. — 91 sujets vaccinés par une inoculation unique d'un virus titrant de 320 à 4.000 U.S. Apparition du pouvoir protecteur fort dans tous

les cas, sans réaction, même minime. La richesse virulente des produits a été exagérée afin d'éprouver l'effet de l'enrobage.

ECHEC DE LA VACCINATION.

a) *Preuves épidémiologiques.* — Elles manquent. On a bien signalé 1 cas de fièvre jaune chez un vacciné, mais il s'agit d'un patient qui, à Zinder, est mort de typhus amaril cinq jours après avoir reçu la 1^{re} inoculation du vaccin.

b) *Preuves sérologiques.* — On n'en trouve pas davantage. Laigret écrit (mars 1933) : « Jusqu'à présent, les sérums de tous nos vaccinés ont répondu positivement à l'épreuve sur souris. Il est prudent de prévoir des échecs. Il en existe au cours de toutes les vaccinations, il existe des sujets qu'on n'arrive jamais à immuniser contre certains antigènes... Une défaillance sur des milliers de vaccinés ne permettrait pas de condamner la méthode. »

DURÉE DE L'IMMUNITÉ.

L'épreuve sérologique des vaccinés tunisiens pratiquée de loin en loin a toujours donné un test de protection fort. Au début de cette année (mars 1933), le contrôle de l'immunité de ces vaccinés a été positif encore, on peut donc conclure que cette immunité dure au moins trois ans (Laigret).

REVACCINATIONS.

Elles ne sont jamais suivies de réactions. Elles ont toujours renforcé une immunité précédemment acquise. Elles sont indiquées chaque fois qu'un réveil épidémique menace d'étendre la maladie. En dehors de ces conditions, il est bon de pratiquer tous les deux ans une vaccination de renforcement (Laigret).

IV. — *Circulation du virus dans le sang des vaccinés.*

Sur les 6 vaccinés ayant présenté des réactions sévères (obs. V, VI, VII, VIII, IX, X), 5 ont été soumis à divers examens en vue de retrouver le virus pathogène dans leur sang.

Obs. V. — 5 cm³ du sang de ce malade sont injectés sous la peau et dans le péritoine d'un macaque neuf, au troisième jour de la fièvre. Le singe a été suivi vingt jours, sa température n'a pas dépassé 39°5. Son sérum en fin d'expérience ne s'est pas montré protecteur.

Du sang du troisième jour également a été inoculé dans le cerveau de 3 souris, qui n'ont rien présenté.

Obs. VI. — 6 souris ont été inoculées avec le sang prélevé le premier jour de la fièvre, 3 autres souris ont été inoculées avec le sang du second jour. Elles n'ont rien présenté.

Obs. VII. — Le sang prélevé au cinquième jour des accidents est injecté au macaque qui a déjà servi pour le malade de l'observation V. Cette inoculation n'a déterminé ni réaction ni immunité.

3 souris inoculées intracérébralement avec le même sang du cinquième jour n'ont pas réagi.

Obs. VIII et IX. — Un macaque et plusieurs souris ont été inoculés avec le sang du premier malade, avec le sang et le liquide céphalo-rachidien du second. Aucun des animaux ne s'est infecté.

Ces expériences ne sont pas édifiantes :

Les observations VIII et IX ne relatent pas à quel moment le sang a été prélevé. Dans l'observation VII, le sang a été prélevé le cinquième jour. Nous avons vu à propos des contaminations accidentelles qu'à ce moment les inoculations à la souris pouvaient être négatives. Le sang éprouvé dans le cas de l'observation V a déterminé de la fièvre chez le singe. Il se pourrait que le sang du macaque prélevé à ce moment se soit révélé virulent au cours de réinoculations sériees à la souris ou à d'autres singes. La non-immunisation du macaque prouve peut-être seulement que le virus se trouvait en faible quantité dans le sang inoculé.

L'observation VI fournit des indications plus précises, car, en effet, si le sang des vaccinés est effectivement virulent, cette virulence a le plus de chances de se manifester au cours des inoculations qui sont faites avec le sang du pre-

mier et du deuxième jours de la réaction. (Voir les inoculations accidentelles.)

Rappelons, d'autre part, que Mathis, expérimentant à Dakar, n'a pas pu lui non plus mettre en évidence la virulence du sang des vaccinés. (Voir passage du virus par les moustiques.)

Mais en face de ces recherches limitées à cause même de cette restriction, il est difficile d'affirmer que le sang des vaccinés est ou n'est pas virulent. Ce qui est certain en tout cas, c'est que, dans les réactions les plus fortes qui aient été observées, cette virulence n'était pas évidente.

CHAPITRE VII

ETUDE CRITIQUE

Sous ce titre, nous nous proposons de rappeler les questions essentielles que soulève la vaccination contre la fièvre jaune.

I. — *La vaccination est-elle efficace ?*

La réponse à cette question est faite par le Docteur Y. Biraud au rapport épidémiologique de la Société des Nations (août-sept. 1935). « Nous pouvons constater que les deux méthodes (de vaccination) présentent une incontestable efficacité, comme en témoignent l'absence de cas déclarés chez les vaccinés, et surtout les tests de séro-protection effectués avec leur sérum. »

Les deux raisons sur lesquelles s'appuie une telle réponse se résument ainsi qu'il suit :

A. — *Preuves épidémiologiques.*

a) *Au laboratoire.* — De 1927 à 1931, on compte 27 cas de contamination accidentelle dans les laboratoires d'Amérique du Nord et d'Europe, c'est-à-dire sous des latitudes où la fièvre jaune naturelle ne peut fausser les statistiques (Stéfanopoulo).

Depuis que la vaccination est pratiquée on n'a plus signalé 1 seul cas de telle contamination. Ce résultat doit être porté surtout à l'actif de la séro-vaccination, car c'est ce procédé d'immunisation qui est appliqué à New-York, à Londres et

à Paris, alors que la virus-vaccination n'est employée qu'à Anvers.

b) *Dans les zones d'endémicité amarile.* — Depuis que la vaccination de Laigret a été réalisée en grand en A. O. F., il ne s'est pas déclaré d'épidémie, au cours de laquelle une preuve définitive de l'efficacité de la vaccination aurait pu être établie si on avait vu résister tous les vaccinés et les non-vaccinés être atteints par le mal.

D'une manière moins éclatante, mais qui a tout de même sa valeur, la preuve épidémiologique est constituée par le fait « qu'aucun cas de fièvre jaune n'a été déclaré jusqu'à ce jour chez des sujets ayant subi les trois inoculations de la vaccination ».

Un cas de typhus amaril survenu chez un vacciné au Niger mérite d'être précisé : « Ce patient, en pleine incubation lorsqu'il reçut le 1^{er} vaccin, mourut de fièvre jaune cinq jours plus tard. » (Laigret.)

Les nombreux Syriens vivant en nomades en A. O. F., et dans des conditions sanitaires lamentables, payaient avant la vaccination, et en dehors même des épidémies, un lourd tribut à la maladie. Depuis la vaccination, on n'a plus signalé 1 cas de fièvre jaune chez ces sujets.

« A la fin de juillet 1934, un officier mourait de fièvre jaune à Zinder. En quelques jours, 5 nouveaux cas étaient déclarés; ce qui représente, pour une population européenne de moins de 100 habitants, un début de véritable épidémie... Dès l'annonce du premier cas, le gouverneur général Brévié décida qu'un médecin vaccinateur se rendrait à Zinder. Le Docteur Rivoalen s'offrit pour accomplir la mission. Il emporta de Dakar du vaccin en bouteilles Thermos remplies de glace et gagna Zinder en avion où 113 personnes de la ville et des postes voisins furent vaccinées. »

Depuis cette vaccination, et jusqu'à ce jour, aucun cas de fièvre jaune n'a été signalé chez ces vaccinés.

Dans la Côte d'Ivoire, la vaccination fut entreprise dans

des conditions analogues d'épidémie naissante : des cas étaient signalés à la fois dans le nord de Tihini et dans le sud, sur la lagune. En quelques jours, on comptait 6 décès. Dans cette colonie, on ne signale pas davantage de typhus amaril survenu par la suite chez les vaccinés.

La vaccination au Sénégal et dans les autres colonies du groupe ne fut pas sur-le-champ aussi édifiante, car la fièvre jaune n'y sévissait plus au moment où la vaccination y fut appliquée; en revanche, l'expérience de Dakar fut très complète au point de vue de l'étude, des réactions post-vaccinales.

Les résultats de cette expérience nous conduisent à examiner maintenant les preuves sérologiques de l'immunisation.

B. — Preuves sérologiques.

Quel que soit le procédé de la vaccination employée, les résultats sont les mêmes : dans 100 p. 100 des cas contrôlés, l'immunité est acquise. Le sérum des vaccinés protège également le macaque contre l'action du virus normal et la souris contre l'action du virus neurotrope.

En fait, le test de protection de la souris a été seul employé quand la vaccination s'est faite sur une grande échelle. Peut-on affirmer sur cette seule épreuve la réalité de l'immunisation ? Nous nous sommes déjà expliqué sur ce point. Par ailleurs, le crédit qu'on accorde généralement au test intracérébral de protection de la souris nous dispense d'insister davantage. Notons seulement en passant que Grall (1935) met en doute la spécificité de ce test, qu'on trouverait positif chez des indigènes de l'Oubangui-Chari, qui, interrogés sur leurs maladies passées, ne se souviennent que du pian ou de la fièvre rouge congolaise.

Le Docteur Biraud fait remarquer que Grall ne fonde son hypothèse que sur l'interrogatoire des indigènes. « Or, si l'on songe à la bénignité de certaines atteintes chez le noir surtout, à la banalité de leurs symptômes, on ne peut que douter de la possibilité de ce diagnostic rétrospectif. »

Chez d'autres médecins ayant une grande expérience clinique de la fièvre jaune, la déficience à l'égard du test de protection est le fait surtout que ce test est pratiqué avec un virus neurotrope dont les manifestations diffèrent de celles qu'ils connaissent. « Psychologiquement explicable, cette hypothèse de virus neurotrope de sortie, de virus non amaril qui serait apparu au cours des passages chez la souris, est difficilement soutenable. » Et le Docteur Biraud conclut que, pour mettre en doute la spécificité du test de séro-protection de la souris, il faudrait faire abstraction :

- « a) de la multiplicité des succès d'adaptation de souches différentes à la souris dans les laboratoires indépendants;
- » b) de l'identité des résultats des tests de séro-protection pratiqués avec le singe et la souris (voir chap. II);
- » c) Des constatations épidémiologiques au sujet des tests et leur confirmation histo-pathologique (voir chap. II);
- » d) de l'action immunisante indéniable de la vaccination avec le virus neurotrope contre le virus viscéro-trope (voir chap. III);
- » e) Enfin, et surtout, la réversibilité du virus neurotrope à la forme originelle » (voir chap. III). »

II. — *La vaccination est-elle dangereuse ?*

Elle pourrait l'être pour le *vacciné* ou pour la *collectivité*.

A. — *Pour le vacciné.*

Cette question a été soulevée par Findlay, surtout à l'égard de la virus-vaccination.

La réalité des risques que courent les vaccinés inoculés avec le virus seul n'est pas niable; elle n'a pas été niée par Laigret lui-même, qui écrit (1933) : « L'immunisation avec

le virus vivant est une opération sérieuse qui doit être pratiquée avec la plus grande prudence. »

Après l'application en grand de la méthode, on a été mieux fixé sur l'étendue de ce risque individuel. Nous avons rapporté en détail les réactions qu'on a observées : nous les rappelons sous forme statistique.

On relève : 30 p. 100 de réactions fébriles : plutôt malaise que maladie, cette réaction dure au maximum quarante-huit heures; elle oblige exceptionnellement le patient à abandonner ses occupations.

3 fois sur plus de 3.000 vaccinations, la réaction a été sévère mais curable sans séquelles.

Dans 70 p. 100 des cas, l'immunité a été acquise silencieusement.

Il est important d'ajouter que cette statistique peut être améliorée. La vaccination, depuis 1934, a été appliquée presque exclusivement « aux colonies sous la menace d'une épidémie chez tous les sujets valides ». Or, il apparaît que, toutes choses égales du côté de la virulence des vaccins, l'état de santé des sujets, leur âge, les conditions climatiques dans lesquelles la vaccination a été entreprise, conditionnent souvent l'apparition même et l'intensité des réactions.

Au passage, nous avons signalé cette différence de comportement individuel. Précisons, en outre, que, parmi les 3 sujets ayant sévèrement réagi, l'un (obs. VIII) était atteint de lithiase rénale et qu'un autre (obs. X), âgé de 59 ans, était albuminurique et manifestement déprimé par de longs séjours coloniaux.

Voilà une part de détermination des accidents qu'il est donné aux vaccinateurs de réduire en réalisant la vaccination dans les régions tempérées sur des sujets jeunes en bon état de santé.

On n'accepte pas plus pour la prophylaxie d'autres maladies de vacciner indifféremment tous les sujets. Peut-on exiger de la vaccination anti-amarile qui use d'un virus vivant d'être plus maniable et moins nocive ?

A la charge de la séro-virus-vaccination, on ne relève pas de réactions aussi sévères que celles qui ont été déterminées par la virus-vaccination seule.

Les réactions d'intensité moyenne (sans qu'on puisse préciser rigoureusement si elles sont dues au sérum ou au virus) (Nicolle), comparables par leur caractère et leur durée aux réactions fébriles de la vaccination de Laigret, atteignent à la fréquence de 15 p. 100.

Les réactions dues de toute évidence au sérum (anaphylaxie ou maladie sériques), et qui ont été absolument bénignes sauf une fois (cas n° 278), se retrouvent dans 47 p. 100 des cas :

43 p. 100 des vaccinés ont été immunisés silencieusement. Dans ce dernier mode de vaccination, Findley précise qu'en augmentant la quantité de sérum injectée (en la fixant pour le sérum de Pettit au minimum de 0,3 cm³ par kilo), on supprime régulièrement l'action pathogène du virus sans diminuer en rien ses qualités antigéniques.

D'autre part, en augmentant ainsi la séro-protection, les accidents sériques ne sont ni plus fréquents ni plus sévères.

En résumé : « La sécurité du vacciné lui-même paraît grande avec les deux méthodes *quad vitam* tout au moins, puisqu'on n'a signalé aucun décès de part et d'autre.

» Les réactions les plus sévères ont été observées avec le virus seul, mais elles l'ont été rarement, et par ailleurs, le nombre de vaccinations effectuées avec cette méthode étant plus élevé, les occasions d'accidents étaient plus nombreuses.

» La sérum-virus-vaccination, si elle provoque rarement des réactions marquées, a, par contre, du fait de l'injection de sérum hétérologue qu'elle comporte, l'inconvénient de provoquer chez certains sujets des réactions anaphylactiques désagréables. » (Dr Biraud, rapp. Epidém., S. D. N., 1935.)

B. — Pour son entourage.

Findlay accuse encore la vaccination avec le virus seul de constituer une source où les moustiques vecteurs peuvent puiser et ainsi transmettre l'infection.

Findlay fonde sa critique sur l'expérimentation chez le singe. Le virus circulerait dans le sang après la vaccination, pourrait être repris par les *Aedes*, et être réinoculé tel quel à des sujets réceptifs ou même, ce qui serait plus grave, récupérer par ce passage son viscérotropisme ancestral.

En fait, nous avons vu que :

1° Chez l'animal :

- a) Le passage du virus neurotrope dans le moustique est exceptionnel avec le virus récemment adapté;
- b) qu'il n'a pas pu être réalisé quand le virus comptait plus de 100 passages chez la souris;
- c) que, dans le cas où le virus est effectivement passé dans le corps des moustiques, ceux-ci ne l'ont inoculé au singe que 4 fois au cours de nombreuses expériences;
- d) que le viscérotropisme n'a jamais pu être révélé par ces passages.

2° Chez l'homme : La recherche du virus dans le sang des vaccinés à l'occasion des réactions qu'ils ont présentées, ou systématiquement à titre d'enquête, a toujours été négative dans la virus-vaccination.

La seule recherche positive concerne un sujet de Beurepaire-Aragao (voir chap. V) qui avait subi la séro-virus-vaccination, et à partir du sang duquel on put effectuer en série des inoculations intracérébrales à la souris.

Nous avons vu que les tentatives destinées à réaliser l'infection des moustiques sur des hommes vaccinés ont régulièrement échoué (voir chap. III).

Enfin la vaccination pratiquée sur une vaste échelle en A. O. F., dans des régions où l'index stégomien est élevé, n'a été suivie d'aucun réveil épidémique.

III. — *La technique peut-elle être simplifiée ?*

A. — Virus-vaccination.

On a reproché à la vaccination de Laigret de comporter 3 inoculations espacées.

On sait que cette technique des inoculations sériées a été généralisée pour la vaccination antidiphthérique, par exemple; le principe qui préside au choix d'une telle technique est d'assurer à la méthode une innocuité et une efficacité plus grandes. Ce principe était plus particulièrement applicable dans la vaccination anti-amarile où, comme nous avons vu, des doses importantes de virus vivant ne pouvaient pas, sans risques sérieux, être introduites d'emblée dans l'organisme.

Cependant, Laigret a su faire tomber l'objection qui était faite à sa méthode en mettant à la disposition des médecins un vaccin « enrobé » d'une teneur virulente élevée, inoculable en une seule fois. Cette méthode simplifiée ne doit pas, à notre avis, se substituer définitivement à la vaccination en trois temps, parce que précisément le principe général des inoculations successives mérite d'être respecté ici plus qu'ailleurs. Toutefois, par cette nouvelle technique, une orientation inédite peut être donnée à l'immunisation : en effet, le virus enrobé, dont la diffusion est lente et l'innocuité plus certaine que celle des vaccins secs, pourrait se substituer à ces derniers dans la technique des inoculations espacées progressivement virulentes.

B. — Séro-virus-vaccination.

L'attention des vaccinateurs a été retenue, d'une part, par les modifications possibles à apporter à la préparation du sérum. Ces modifications n'ont rien de spécial. Il s'agit essen-

tiellement de le purifier et de le concentrer. Actuellement, ces perfectionnements sont réalisés.

D'autre part, la double inoculation en un seul jour de sérum et de virus est facilement applicable, elle ne soulève pas d'obstacle, elle n'a pas à être simplifiée, au contraire, la tendance actuelle conduit les promoteurs de la séro-vaccination initiale à pratiquer dans les trois semaines qui suivent la vaccination initiale une inoculation de virus seul (sous-cutanée ou intradermique) qui prévient le fléchissement ultérieur de l'immunité.

On a remarqué, en effet, que l'immunité conférée par la sérum-virus-vaccination initiale, qui est bien, comme nous l'avons vu, une immunité active, satisfaisante dans tous les cas, tend cependant à fléchir dans les mois qui suivent, et c'est pour cette raison que l'inoculation de « renforcement » est souvent pratiquée (Stéfanopoulo, communication orale).

CONCLUSIONS

I. — La vaccination contre la fièvre jaune use du virus amaril modifié par adaptation au système nerveux de la souris.

II. — Cette vaccination a été appliquée à des milliers d'individus au cours de ces quatre dernières années.

III. — Le virus introduit à l'état vivant dans l'organisme du vacciné peut provoquer des réactions morbides qui traduisent ses affinités nouvelles en même temps que la persistance d'un pouvoir pathogène ancestral du type amaril.

IV. — Pour prévenir cet effet pathogène, on use de l'un des moyens suivants :

- a) Injection initiale de sérum anti-amaril (sérum de Petit, Stéfanopoulo et Frasey) suivie de l'inoculation du virus;
- b) Inoculation du virus à doses croissantes;
- c) Inoculation unique du virus enrobé dans un corps gras.

Ces moyens ne sont pas absolument efficaces, il persiste pour le vacciné un risque d'infection spécifique réel, mais faible.

V. — L'état de santé des vaccinés, leur âge, les conditions climatériques dans lesquelles la vaccination est entreprise, entrent pour une part dans la détermination des réactions post-vaccinales.

En conséquence, il est recommandable :

a) de pratiquer la vaccination le plus souvent possible dans un climat tempéré;

b) de réserver aux sujets en bon état de santé le bénéfice des inoculations espacées à doses croissantes de virus seul;

c) d'user, pour l'immunisation de sujets âgés ou peu résistants, de la séro-virus-vaccination;

d) d'appliquer de préférence, dans les zones d'endémospadicité, la séro-virus-vaccination.

VI. — L'immunité conférée par la vaccination, vérifiée par les tests sérologiques de protection, paraît confirmée par les statistiques épidémiologiques, bien qu'il manque, pour acquérir une certitude formelle de cette immunisation, l'épreuve d'une épidémie.

VII. — La durée de l'immunité serait d'au moins deux ans. La revaccination est indiquée après cette période, et, dans tous les cas, au cours d'une épidémie.

VIII. — Le risque d'accidents post-vaccinaux opposé au danger redoutable que fait peser la fièvre jaune sur les sujets de race blanche ne permet pas d'hésiter dans l'emploi d'une telle vaccination.

VU : *Le Doyen,*

PIERRE MAURIAC.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président,

H. BONNIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 9 décembre 1935.

Le Recteur de l'Académie,

A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUER (H.). — The Duration of passive immunity in yellow fever. *Amer. Journ. of Trop. Med.*, 6 nov. 1931, t. XI, p. 431.
- BEAUREPAIRE-ARAGAO (de). — Emploi du virus vivant dans la vaccination contre la fièvre jaune. *Ibid.*, 1933, t. CXII, p. 1471.
- Vaccination par le sérum et le virus dans la fièvre jaune. *C. R. de la Soc. de biol.*, août 1931, t. CVIII, p. 1078.
- BERRY et KITCHEN. — Yellow fever accidentely contracted in the laboratory. A study of seven cases. *The Amer. Journ. of Trop. Med.*, 6 nov. 1931, vol. XI, p. 365.
- BOYÉ (Médecin général inspecteur). — Les vaccinations contre la fièvre jaune. *Hygiène sociale*, 25 déc. 1934, t. 129, p. 2923.
- DAVIS (N.), LLOYD et FROBISHER. — The transmission of neurotropic Yellow fever virus by stegomyia mosquitoes. *Journ. of Experim. Med.*, déc. 1932, t. LVI, p. 953.
- FINDLAY. — Premières vaccinations contre la fièvre jaune à Londres. *Off. internat. d'hyg. publ.*, mai 1933, t. XXV, p. 1009.
- FINDLAY et CLARKE. — Immunisation against yellow Fever with attenuated neurotropic virus. *The Lancet*, 3 nov. 1934, p. 893.
- Immunisation contre la fièvre jaune au moyen de virus neurotrophe vivant et de l'immun-sérum hétérologue. *Bull. de l'Acad. de méd.*, 22 janv. 1935, t. CXIII, n° 3.
- The susceptibility of the Hedgehog to yellow fever. *Trans. of Royal Soc. of Trop. Med.*, 1934, t. XXVIII, p. 193 et 333.
- Reconversion of the Neurotropic into the Viscerotrophic Strain of Yellow Fever Virus in rhesus Monkeys. *Ibid.*, 17 avril 1935, t. XXVIII, p. 579.

- LAIGRET (J.). — Recherches expérimentales sur la fièvre jaune. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 3 avril 1933, t. XXI, p. 412.
- Recherches expérimentales sur la fièvre jaune. *Ibid.*, 2 août 1933, t. XXII, p. 198.
- Le contrôle des vaccinations anti-amariles par l'épreuve de protection sur souris. *Ibid.*, 1^{er} mars 1934, t. XXIII, p. 43.
- Sur la vaccination contre la fièvre jaune par le virus de Max Theiler. *Off. internat. d'hyg. publ.*, mai 1934, t. XXVI, fasc. 6.
- Immunisation contre la fièvre jaune. Vaccination et séro-vaccination. *Presse médicale*, 23 janvier 1935, n° 7.
- La vaccination contre la fièvre jaune. *Bull. de la Soc. de pathol. exot.*, 14 juin 1933, n° 3, p. 806.
- L'organisation de la vaccination contre la fièvre jaune en France. *Presse médicale*, 13 oct. 1934, n° 82.
- La vaccination contre la fièvre jaune. Sur une mission pour l'application de la vaccination en Afrique occidentale française. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 4 déc. 1934, t. XXIII, p. 413.
- La vaccination contre la fièvre jaune. Conférence à l'Union coloniale française, Paris, 22 mars 1935.
- La vaccination préventive contre la fièvre jaune. *Revue d'immunologie*, mars 1935, n° 2, p. 113.
- LIGNIÈRES. — La vaccination contre les maladies à virus filtrable. *Bull. Acad. de méd.*, 30 mai 1930.
- LLOYD et PENNA. — Studie of the pathogenesis of neurotropic Yellow Fever Virus in *Macacus rhesus*. *Amer. Journ. of Trop. Med.*, janv. 1933, t. XIII, p. 1 à 46.
- MAHAFFY (A. F.), LLOYD et PENNA. — Two Yeart's Experience With the Intrapéritonéal Protection test in Mice in Epidemiological Studies of Yellow Fever. *Amer. Journ. of Hyg.*, 3 nov. 1933, t. XXVIII, p. 618.
- MATHIS (M.). — Sensibilité du cobaye au virus de la fièvre jaune. *C. R. de la Soc. de biol.*, 1934, t. CXV, p. 842.

- MATHIS (M.). — Sur le pouvoir infectant des *Macacus rhesus* vaccinés contre la fièvre jaune. *Bull. de la Soc. de pathol. exot.*, 8 et 9 févr. 1933, n° 2, p. 310.
- MATHIS (C.), DURIEUX et ADVIER. — La vaccination anti-amarile. Comporte-t-elle des dangers dans les régions où sévit endémiquement la fièvre jaune et où les stégomyies abondent ? *Bull. de l'Acad. de méd.*, 6 nov. 1934, t. CXII, p. 35.
- MATHIS (C.), LAIGRET et DURIEUX. — Trois mille vaccinations contre la fièvre jaune en Afrique occidentale française au moyen du virus vivant de souris atténué par le vieillissement. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 15 oct. 1934, t. CXC, p. 742.
- MATHIS (M.), MARTIN-CHARPENEL et KOLOCHINE. — Adaptation du virus amaril à la souris blanche. *Bull. de la Soc. pathol. exot.*, 10 févr. 1932, t. XXV, p. 533.
- MOLLARET et STÉFANOPOULO. — Le liquide céphalo-rachidien lombaire et sous-occipital dans la fièvre jaune expérimentale du *Macacus rhesus*. *C. R. de la Soc. de biol.*, 15 déc. 1934, t. CXVII, p. 1101.
- NICOLLE (Ch.). — Au sujet de la vaccination contre la fièvre jaune. *Bull. de l'Acad. de méd.*, 19 févr. 1935, t. 113, p. 254.
- NICOLLE (Ch.) et LAIGRET. — La vaccination contre la fièvre jaune par le virus amaril vivant desséché et enrobé. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 29 juill. 1935, t. 201, p. 312.
- PETTIT (A.). — Virus amaril. *Biol. médicale*, oct-nov. 1929, t. XIX, p. 337.
- PETTIT (A.), STÉFANOPOULO et FRASEY (V.). — Sérum anti-amarilique. *C. R. de la Soc. de biol.*, 24 juill. 1928, t. XCIX, p. 541.
- PETTIT (A.) et STÉFANOPOULO. — Utilisation du sérum anti-amaril d'origine animale pour la vaccination de l'homme. *Bull. de l'Acad. de méd.*, 18 juin 1933, t. CX, p. 67.
- La vaccination anti-amarile à l'Institut Pasteur. *Off. internat. d'hyg. publ.*, 1934, t. XXVI, n° 6.

- RAPPORT épidémiologique de la Société des Nations (Docteur Y. BIRAUD), août-sept. 1935.
- RECIO. — Communications orales, févr. 1935.
- ROUBAUD et STÉFANOPOULO. — Recherches sur la transmission par la voie stégomienne du virus neurotrope de la fièvre jaune. *Bull. de la Soc. de pathol. exot.*, févr. 1933, t. XXVI, p. 305.
- SAWYER (W. A.). — Recent Progress in Yellow Fever Research. *Medicine*, 4 déc. 1931, t. X, p. 510.
- SELLARDS et LAIGRET. — Contrôle par épreuve sur *Macacus rhesus* du pouvoir protecteur du sérum des hommes vaccinés contre la fièvre jaune avec le virus de souris. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 13 juin 1932, t. 194, p. 2175.
- Immunisation de l'homme contre la fièvre jaune par l'inoculation du virus de souris. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 2 déc. 1931, t. XXI, p. 229.
- Vaccination de l'homme contre la fièvre jaune. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 2 mai 1932, t. 194, p. 1609.
- Durée de l'immunité consécutive à la vaccination contre la fièvre jaune. *Ibid.*, 12 mars 1934, t. 198, p. 1086.
- STÉFANOPOULO (G.). — Vaccination anti-amarile. *Presse médicale*, 24 juin 1933, n° 50.
- Recherches sur la fièvre jaune expérimentale de la souris et du cobaye. *Ann. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, mai 1934, t. LII, p. 353.
- Communications orales, févr. 1935.
- THEILER (M.). — Studies on the action of Yellow Fever Virus in mice. *Ann. of Trop. Med. and Parasitol.*, 8 juill. 1930, t. XXIV, p. 214.

